



**Angélica da Costa
Ramos**

**Estudo da expressão de *ADAMTS-8* em linhas
celulares de cancro da mama**

**Evaluation of *ADAMTS-8* expression in breast cancer
cell lines**



**Angélica da Costa
Ramos**

**Estudo da expressão de *ADAMTS-8* em linhas
celulares de cancro da mama**

**Evaluation of *ADAMTS-8* expression in breast cancer
cell lines**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando Carlos de Landér Schmitt
Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Prof. Doutora Ana Teresa Moreira de Almeida Santos
Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Joana Cancela de Amorim Falcão Paredes
Investigadora Sénior do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto

agradecimentos

Ao CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente Genética e Oncobiologia) e ao projecto 15/06.

À Prof. Teresa Almeida Santos, por ter aceite realizar este trabalho comigo, pelo entusiasmo e determinação que lhe reconheço em tudo e que me inspiram e estimulam a perseverar.

Ao Prof. Fernando Schmitt, por me ter recebido no seu grupo, pelo apoio directo e indirecto que disponibilizou a este trabalho proporcionando-me um período importante de maturação científica.

À Prof. Sónia Mendo, pela coordenação do Mestrado em Microbiologia Molecular da Universidade de Aveiro e pela disponibilidade incansável.

À Joana Paredes, ao Zé Luís e à Ana Sofia que foram fundamentais técnica e intelectualmente neste trabalho, agradeço todo o auxílio e a boa vontade com que o fizeram. Aos restantes elementos do grupo de Patologia Mamária de IPATIMUP agradeço igualmente. A forma como me receberam e integraram e toda a contribuição que ao longo destes meses possam ter dado a este trabalho, fez com que tudo fosse mais fácil, agradável também.

Aos meus colegas do Serviço de Genética Médica e Reprodução Humana dos HUC, particularmente à Silvana, pelo apoio sobretudo na fase inicial deste projecto.

Aos meus amigos *ipatimupianos*. O melhor de tudo são sempre as pessoas.

Às minhas amigas-irmãs. O mesmo: O melhor de tudo são sempre as pessoas.

Ao meu pai. Pela tolerância e simplicidade incorrumpidas. Creio que incorrumpíveis.

À minha mãe. Porque as mães são sempre as mães.

Aos meus avós. Por tanta coisa.

resumo

ADAMTS-8, um membro da família das ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteases com motivos Trombospondina), é conhecido por inibir a proliferação de células endoteliais, suprimir a vascularização induzida pelo FGF-2 e inibir a angiogénese induzida pelo VEGF. Existem evidências que demonstram a sua sub-regulação no cancro, nomeadamente em cancro do pulmão de não pequenas células por hipermetilação do seu promotor e em neoplasias malignas do sistema nervoso central. No cancro da mama, *ADAMTS-8* parece estar também sub-regulado, no entanto o seu papel e regulação no desenvolvimento destes tumores continua por esclarecer. De forma a clarificar o papel de *ADAMTS-8* no cancro da mama, iniciámos um estudo piloto no qual avalíamos a expressão de *ADAMTS-8* num painel de linhas celulares de cancro da mama e o efeito da metilação do DNA nessa expressão.

A expressão de *ADAMTS-8* foi estudada num conjunto de linhas celulares representativas de diferentes subtipos de cancro da mama (ER-positivas/PR-positivas e ER-negativas/PR-negativas) e em tecido mamário não neoplásico, pelas técnicas de RT-PCR multiplex e PCR em tempo real quantitativo. Adicionalmente, quatro destas linhas celulares foram tratadas com um agente desmetilante (5-Aza-2'-deoxicitidina) e a expressão de *ADAMTS-8* reavaliada.

ADAMTS-8 é expresso em níveis mais elevados no tecido mamário normal comparativamente com qualquer uma das linhas celulares de cancro da mama estudadas. Entre as linhas celulares, as células ER-negativas/PR-negativas apresentaram níveis inferiores de expressão, em comparação com as ER-positivas/PR-positivas. Adicionalmente, o tratamento de desmetilação induziu um aumento dos níveis de mRNA de *ADAMTS-8* numa das duas linhas celulares ER-negativas/PR-negativas. Na outra linha celular ER-negativa/PR-negativa testada, em que não se observou qualquer alteração da expressão após desmetilação, verificou-se, em estudos prévios de aCGH, a deleção da região cromossómica 11q25 onde *ADAMTS-8* está localizado.

Assim, pelos resultados obtidos, podemos concluir que *ADAMTS-8* é sub-expresso em linhas celulares de cancro da mama, comparativamente com o tecido mamário não neoplásico, sendo estes resultados consistentes com estudos previamente realizados. Adicionalmente, encontramos evidências para uma relação entre *ADAMTS-8* e os receptores de estrogénio e progesterona, uma vez que as linhas celulares ER-negativas/PR-negativas mostraram níveis inferiores de expressão de *ADAMTS-8*; além disso, quando uma linha celular ER-negativa/PR-negativa foi tratada com um agente desmetilante, observou-se um aumento estatisticamente significativo da expressão de *ADAMTS-8*. Este resultado pode ser uma consequência da hipermetilação do promotor de *ADAMTS-8* ou, uma vez que não foi observado qualquer efeito nas linhas celulares ER-positivas/PR-positivas, pode reflectir uma acção reguladora da desmetilação de *ER* e/ou *PR* na expressão de *ADAMTS-8*. Estudos subsequentes, usando um painel alargado de linhas celulares de cancro da mama e de carcinomas da mama são necessários para esclarecer esta associação entre *ER* e/ou *PR* e *ADAMTS-8*.

abstract

ADAMTS-8, a member of the ADAMTS family (A Disintegrins and Metalloproteases with Thrombospondin motifs), is known to inhibit endothelial cell proliferation, to suppress FGF-2-induced vascularisation and to inhibit VEGF-induced angiogenesis. There is evidence for a downregulation of ADAMTS-8 in cancer, namely in non-small-cell lung cancer by promoter hypermethylation and in brain tumours. In breast cancer, *ADAMTS-8* seems also to be downregulated but its role and regulation in mammary tumour development is largely unclear. To unravel the role of ADAMTS-8 in breast cancer, we initiated a pilot study where we evaluated *ADAMTS-8* expression in a panel of breast cancer cell lines and the effect that DNA methylation might have in its expression.

ADAMTS-8 expression was screened in a set of breast cancer cell lines, representing different subtypes of breast tumours (e.g. ER-positive/PR-positive and ER-negative/PR-negative) and in non-neoplastic mammary tissue. Both multiplex RT-PCR and quantitative real time PCR was used to evaluate *ADAMTS-8* expression. Additionally, four cell lines were treated with a demethylating agent (5-Aza-2'-deoxycytidine) and the *ADAMTS-8* expression re-examined.

ADAMTS-8 was found to be expressed in higher levels in normal breast tissue than in any of the cell lines studied. Among the cell lines, ER-negative/PR-negative cells presented lower levels of expression than ER-positive/PR-positive. The demethylation treatment induced an increase of *ADAMTS-8* mRNA levels in one of the two ER-negative/PR-negative cell lines. In another ER-negative/PR-negative cell line, in which we did not observe any alteration after demethylation, we found that previous studies by aCGH, showed a chromosomal deletion of the 11q25 region where the *ADAMTS-8* is located.

ADAMTS-8 was found to have its expression downregulated in the breast cancer cell lines in comparison to non-neoplastic mammary tissue, which is consistent with previous studies. Additionally, evidences for a relationship between ADAMTS-8 and estrogen and progesterone receptors were found. First, ER-negative/PR-negative cells also showed lower expression levels of *ADAMTS-8*. Second, when an ER-negative/PR-negative cell line was treated with a demethylating agent, a strong increase of *ADAMTS-8* expression was observed. This increase may be a consequence of *ADAMTS-8* promoter hypermethylation or, since no effect was observed in the ER-positive/PR-positive cell lines, it may reflect a regulatory action of *ER* and/or *PR* demethylation on *ADAMTS-8* expression. Further studies making use of a wider panel of breast cancer cell lines and breast carcinomas are needed to clarify this association between ER and/or PR and ADAMTS-8.

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	13
1. CANCRO	15
2. CANCRO DA MAMA	18
2.1. EPIDEMIOLOGIA	18
2.2. ANATOMIA E DESENVOLVIMENTO NORMAIS DA MAMA	19
2.3. FACTORES DE RISCO	21
2.4. PERFIS DE EXPRESSÃO GÉNICA	22
2.5. FACTORES DE PROGNÓSTICO E PREDICTIVOS	24
3. METILAÇÃO DO DNA NO CANCRO DA MAMA	27
3.1. O PROCESSO DE METILAÇÃO EM MAMÍFEROS	28
3.2. HIPERMETILAÇÃO E SILENCIAMENTO GÉNICO	28
4. FAMÍLIA DAS ADAMTS	31
4.1. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL	31
4.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS	33
4.3. EXPRESSÃO DAS ADAMTS	34
4.4. REGULAÇÃO DAS ADAMTS	35
4.5. ADAMTS-8	36
OBJECTIVOS	37
MATERIAL E MÉTODOS	41
1. MATERIAL	43
2. MÉTODOS	44
2.1. DESMETILAÇÃO	44
2.2. EXTRACÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	44

2.3. RT-PCR MULTIPLEX	44
2.4. WESTERN BLOTTING PARA O ER E O PR	45
2.5. PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO	46
2.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE PCR EM TEMPO REAL	47
RESULTADOS	49
1. EXPRESSÃO DE <i>ADAMTS-8</i> EM LINHAS CELULARES DE CANCRO DA MAMA	51
1.1. RT-PCR MULTIPLEX	51
1.2. PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO	52
2. EFEITO DA METILAÇÃO NA EXPRESSÃO DE <i>ADAMTS-8</i>	53
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	61
REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células cancerosas.

Figura 2 – Taxas de incidência e mortalidade por cancro.

Figura 3 – A glândula mamária.

Figura 4 – Perfis de expressão génica do cancro da mama.

Figura 5 – Processo de metilação de citosinas nos mamíferos.

Figura 6 – Hipermetilação e silenciamento génico.

Figura 7 – Activação génica através do receptor de estrogénio.

Figura 8 – Relação estrutural e evolucionária das diferentes ADAMTS.

Figura 9 – Expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário não neoplásico.

Figura 10 – Expressão do ER e do PR nas linhas celulares e quantificação relativa da expressão de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real em linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário normal.

Figura 11 – Expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama ER-positivas/PR-positivas e ER-negativas/PR-negativas após tratamento com um agente desmetilante.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expressão dos genes *ADAMTS* em tecidos humanos.

Tabela 2 – Linhas celulares de cancro da mama representativas de diferentes subtipos de carcinomas da mama.

Tabela 3 – *Primers* utilizados para a amplificação dos genes *ADAMTS-8* e *GAPDH*.

ABREVIATURAS

ADAM – **A** Disintegrin and **M**etalloproteinase (Desintegrina e metaloprotease)

ADAMTS – **A** Disintegrin-like and **M**etalloproteinase with **T**hrombospondin motifs (Desintegrina e metaloprotease com motivos trombospondina)

aCGH - **A**rray **C**omparative **G**enomic **H**ybridization (*Array* de hibridação genómica comparativa)

Bp – **B**ase **p**air (Par de base)

BRCA – **B**Reast **C**ancer susceptibility genes (Genes de susceptibilidade ao cancro da mama)

C – **C**itosina

CD36 – **C**luster of **D**ifferentiation **36** (Grupo de diferenciação 36)

CDH1 – **C**adherin **1** (Caderina 1)

CDH13 – **C**adherin **13** (Caderina 13)

cDNA – complementary **DNA** (DNA complementar)

CDR – **C**ystein **D**omain **R**ich (Domínio rico em cisteína)

CK – **C**ytokeratins (Citoqueratinas)

C – terminal – **C**arboxilic **t**erminal domain (Domínio terminal carboxílico)

CUB – Complement **C**1r/**C**1s, **U**egf, **B**mp1 (Complemento C1r/C1s, Uegf, Bmp1)

DMSO – **D**imetil-**S**ulfóxido (Sulfóxido dimetílico)

DNA – **D**eoxyribonucleic **A**cid (Ácido desoxirribonucleico)

DNMT – **DNA** **M**ethyltransferase (Metiltransferase de DNA)

ECL – **E**nhanced **C**hemiluminiscence (Quimioluminescência aumentada)

ECM – **E**xtra**C**ellular **M**atrix (Matriz extracelular)

EGF – **E**pidermal **G**rowth **F**actor (Factor de crescimento epidérmico)

EGFR – **E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor (Receptor do factor de crescimento epidérmico)

ER – **E**strogen **R**eceptor (Receptor de estrogénio)

ERE – **E**strogen **R**esponsive **E**lements (Elementos responsivos ao estrogénio)

FBS – **F**etal **B**ovine **S**erum (Soro bovino fetal)

FGF – **F**ibroblast **G**rowth **F**actor (Factor de crescimento fibroblástico)

G – **G**uanina

GON-1 – **A**bnormal **G**onad **D**evelopment (Desenvolvimento gonadal anormal)

GSTP1 – **G**lutathione **S**-transferase **P**hosphate **1** (Glutathione S-transferase fosfato 1)

HDAC – **H**istone **D**eacetylase (Desacetilase de histona)

HE – **H**ematoxilina-**E**osina

HER2 – **H**uman **E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor **2** (Receptor do factor de crescimento epidermal humano 2)

IGF – **I**nsulin-like **G**rowth **F**actor (Factor de crescimento tipo insulina)

Min – **M**inutos

MMP – **M**atrix **M**etalloproteinases (Metaloproteases de matriz)

mRNA – **M**essenger **R**ibonucleic **A**cid (Ácido ribonucleico mensageiro)

N-terminal – **A**mino-**t**erminal domain (Domínio terminal amínico)

P53 – **P**roteína **53**

PBS – **P**hosphate **B**uffered **S**aline (Tampão fosfato)

P-caderina – **H**uman **P**lacental **C**adherin (Caderina placentar humana)

PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Reacção em cadeia da polimerase)

PDGF - **P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor (Factor de crescimento derivado de plaquetas)

PR – **P**rogestosterone **R**eceptor (Receptor de progesterona)

PLAC – **P**rotease and **L**acunin (Protease e lacunina)

RIZ1 – **R**etinoblastoma **P**rotein-**I**nteracting **Z**inc-**F**inger **G**ene **1** (Gene 1 dedo de zinco que interactua com a proteína retinoblastoma)

RNA – **R**ibonucleic **A**cid (Ácido ribonucleico)

RPM – **R**otações **P**or **M**inuto

RT-PCR – **R**everse **T**ranscriptase **P**CR (PCR da transcriptase reversa)

Seg – **S**egundos

SRBC – **Sdr**-related Gene Product that **B**inds to **C**-kinase (Produto génico relacionado com *Sdr* que se liga à Cinase C)

SYK – **S**plenic **T**yrosine **K**inase (Tirosina Cinase Esplénica)

TGF α – **T**ransforming **G**rowth **F**actor – alpha (Factor de crescimento para transformação – alfa)

TGF β – **T**ransforming **G**rowth **F**actor – beta (Factor de crescimento para transformação – beta)

TIMP – **T**issue **I**nhibitor of **M**atrix **M**etalloproteinase (Inibidor de tecidos de metaloproteases de matriz)

TMS1 – **T**arget of **M**ethylation-Induced **S**ilencing (Alvo de silenciamento induzido pela metilação)

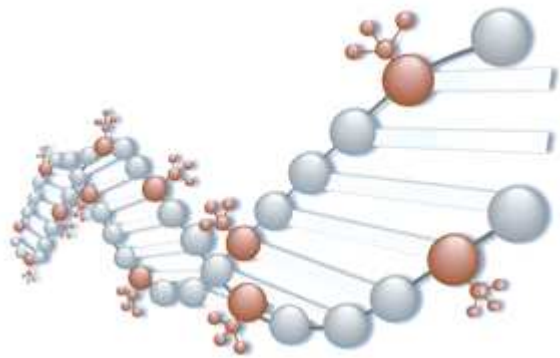
TSP – **T**hrombo**s**pondin (Trombospondina)

TSR – **T**hrombo**s**pondin Type 1 **R**epeat (Repitição de trombospondina tipo 1)

UDLT – **U**nidade **D**ucto-**L**obular **T**erminal

VEGF – **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor (Factor de crescimento endotelial vascular)

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

1. CANCRO

O cancro contribui para cerca de um quinto de todas as mortes nos países industrializados do Mundo Ocidental. Uma em três pessoas ao longo da sua vida será tratada por doença oncológica [1]. São muitas e variadas as causas de cancro. Estas incluem a predisposição genética, influências ambientais, agentes infecciosos e o próprio envelhecimento [2].

O cancro é uma doença que se caracteriza por alterações dinâmicas no genoma. Várias evidências indicam que a tumorigénese na espécie humana é um processo que compreende múltiplas alterações genéticas que levam a uma progressiva transformação de células humanas normais em células malignas. Estudos morfológicos de diferentes locais de determinados órgãos mostram lesões que parecem representar etapas intermédias deste processo, em que as células evoluem da normalidade, via uma série de estádios pré-malignos, para cancros invasivos [3]. De facto, o estudo de cancros humanos e modelos animais leva a crer que o processo tumoral ocorre de uma forma semelhante ao mecanismo de evolução descrito por Darwin, em que uma sucessão de alterações genéticas, cada uma conferindo um ou outro tipo de vantagem de crescimento, levam a uma progressiva conversão de células normais em células neoplásicas [3, 4].

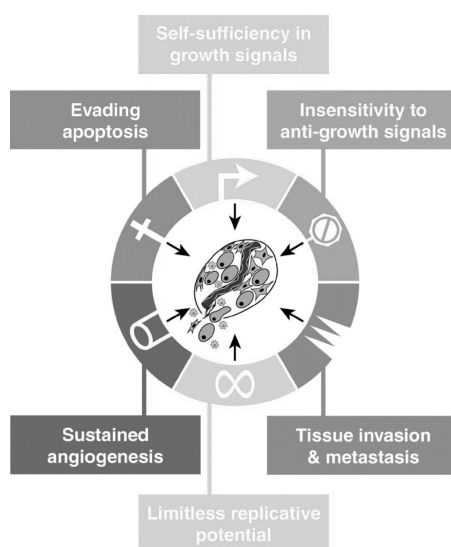


Figura 1 – Capacidades adquiridas pelas células cancerosas. Hanahan e Weinberg sugerem que, através de diversos mecanismos, a maioria dos cancros adquirem o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. (Adaptado de Hanahan and Weinberg, 2000)

Existem mais de 100 tipos diferentes de cancro, observando-se ainda diferentes subtipos de tumores que afectam o mesmo tecido/orgão. No entanto, pensa-se que esta variedade é a manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que são comuns em todos os tipos de cancro (**Figura 1**) [5]:

- (i) **Auto-suficiência de sinais de crescimento:** Nenhuma célula normal possui a capacidade de proliferar na ausência de sinais estimuladores de crescimento. As células neoplásicas tornam-se independentes desta estimulação de crescimento exógena, produzindo muitos dos seus factores de crescimento ou sobre-expressando os receptores destas moléculas. A produção de PDGF e de TGF α por glioblastomas e sarcomas [6] e a sobre-regulação do EGFR nos cancros do estômago, do sistema nervoso central e da mama são um exemplo destes mecanismos através dos quais as células neoplásicas se tornam auto-suficientes em relação aos sinais de crescimento exógenos [7].
- (ii) **Insensibilidade a sinais inibidores de crescimento:** Num tecido normal, múltiplos sinais anti-proliferativos actuam de forma a manter a quiescência celular e a homeostasia tecidular. De forma a sobreviver e a proliferar, as células neoplásicas têm que evadir estes sinais anti-proliferativos, muitos dos quais, como por exemplo o TGF β , se relacionam com a via metabólica da proteína retinoblastoma (pRB). Esta via metabólica bloqueia a proliferação celular através do sequestro e alteração da função de factores de transcrição que controlam a expressão de um conjunto de genes envolvidos na progressão celular da fase G1 para a fase S e a sua ruptura está associada à proliferação celular insensível a factores inibidores de crescimento que geralmente actuam ao longo desta via.
- (iii) **Evasão à apoptose:** A capacidade de uma população de células neoplásicas expandir em número não depende só da taxa de proliferação celular mas também da taxa de morte celular (ou apoptose). A resistência à apoptose pelas células neoplásicas pode ser adquirida por vários mecanismos, no entanto, o mais comum consiste em mutações no gene supressor tumoral p53, um gene chave na manutenção da integridade do DNA e na indução da cascata apoptótica [8], sendo observadas mutações neste gene em mais de 50% dos cancros humanos.
- (iv) **Aumento do potencial de replicação:** As células dos mamíferos possuem um programa intrínseco que limita o seu potencial replicativo. De modo a completar o processo de progressão tumoral, uma população de células pré-malignas necessita de ultrapassar a barreira da mortalidade e adquirir um potencial

replicativo ilimitado [9]. Uma das formas que as células neoplásicas possuem de adquirir esta replicação ilimitada é evitando o encurtamento dos telómeros [10] após cada ciclo celular, a maioria delas sobre-expressando a enzima telomerase, a qual adiciona repetições de hexanucleotídeos aos locais terminais do DNA telomérico [11].

- (v) **Sustentação da angiogénese:** O oxigénio e os nutrientes fornecidos pelos vasos sanguíneos são essenciais para a função e sobrevivência celulares. Num tecido formado, o crescimento de novos vasos celulares – angiogénese – é transitório e finamente regulado. A neovascularização é um pré-requisito para a rápida expansão clonal, característica da formação de tumores macroscópicos [12-14]. As neoplasias parecem activar a angiogénese pela alteração do balanço entre indutores e inibidores da angiogénese [13]. Uma das estratégias para alterar este balanço envolve a alteração da transcrição génica. Muitas neoplasias apresentam um aumento da expressão de VEGF e/ou FGFs, moléculas indutoras de angiogénese, em relação ao tecido normal, enquanto que outras apresentam uma diminuição da expressão de inibidores endógenos, como a trombospondina-1.
- (vi) **Invasão tecidular e metastização:** A capacidade de invadir e metastizar permite às células neoplásicas escaparem ao tumor primário e colonizarem novos locais do organismo onde, pelo menos inicialmente, os nutrientes e o espaço não são limitados. Estes dois processos estão intimamente interligados e utilizam estratégias operacionais semelhantes, que envolvem alterações na ligação física das células ao seu microambiente e a activação de proteases extracelulares específicas. Várias classes de proteínas estão alteradas nas células com capacidade de invadir e metastizar, entre as quais as proteínas de adesão célula-célula, como as caderinas, e as proteínas que ligam as células a substratos da matriz extracelular, como as integrinas. Uma das moléculas de adesão célula-célula, cuja função está alterada na maioria dos cancros epiteliais, é a E-caderina [15].

2. CANCRO DA MAMA

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Nas mulheres, o carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em todo o mundo e a principal causa de mortalidade por cancro (**Figura 2**) [16]. Em 2002, foi diagnosticado cancro da mama a cerca de 1 milhão de mulheres, sendo que mais de 400 000 morreram desta patologia (www.oms.org). O cancro da mama pode também ocorrer nos homens, embora a sua incidência seja muito menor, correspondendo a cerca de 1% do número total de cancros da mama diagnosticados. Esta patologia é também a primeira causa de morte por cancro nas mulheres portuguesas, sendo uma em cada treze mulheres vítima deste tipo de neoplasia maligna. Por ano são registados cerca de 4500 novos casos de cancro da mama em Portugal [17].

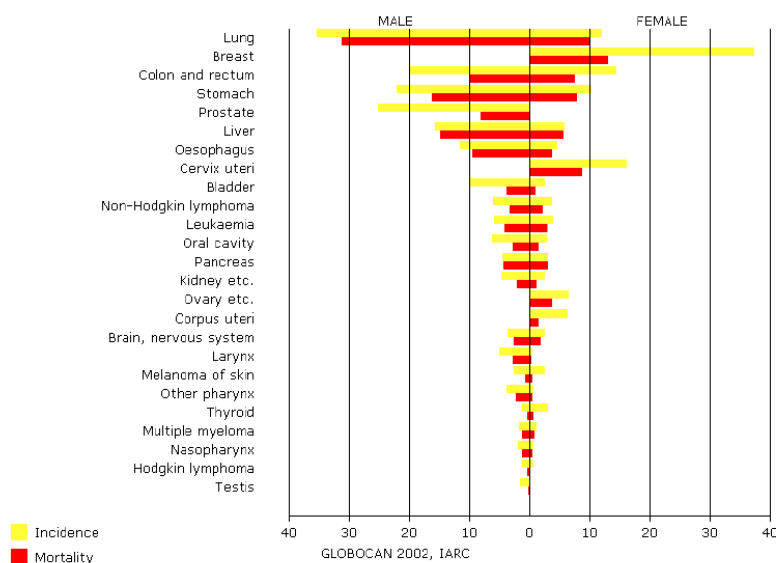


Figura 2 – Taxas de incidência e mortalidade por cancro. Valores de incidência e mortalidade por cada 100 000 habitantes. No homem o cancro do pulmão apresenta as maiores taxas de incidência e mortalidade, enquanto que na mulher as taxas mais elevadas estão relacionadas com o cancro da mama. (Adaptado da *International Agency for Research on Cancer*).

Embora a incidência de cancro da mama aumente a cada ano nos países Ocidentais, a taxa de mortalidade por esta neoplasia tem vindo a decrescer, de modo que cerca de 90% das mulheres com este diagnóstico sobrevivem pelo menos por um período de 5 anos [18]. De facto, os recentes avanços das técnicas imagiológicas para a detecção de lesões mamárias não palpáveis, que permitem a detecção dos tumores mamários em estadios iniciais da doença, bem como o uso de esquemas de quimioterapia mais eficientes, têm vindo a contribuir para um melhor prognóstico e aumento da sobrevivência das mulheres com cancro da mama [19]. No entanto, 20-30% das mulheres com tumores da mama primários sem envolvimento de gânglios linfáticos axilares, ainda desenvolvem doença recorrente à

distância [20]. Nos últimos anos, avanços importantes têm vindo a ser realizados de forma a clarificar os mecanismos subjacentes ao processo de tumorigénese, bem como a identificar novos factores predictivos e de prognóstico do cancro da mama [21, 22].

2.2. ANATOMIA E DESENVOLVIMENTO NORMAIS DA MAMA

A mama de uma mulher adulta é composta por um sistema de ductos epiteliais ramificados a partir do mamilo, que se estendem radialmente ao longo do estroma e que terminam em unidades ducto-lobulares terminais (UDLT), as unidades anátomo-funcionais da mama. Na mulher adulta, os ductos terminais ramificam-se em estruturas constituídas por pequenos alvéolos secretores denominados ácinos e que, no seu conjunto, constituem o lóbulo (**Figura 3**). O estroma interlobular da glândula mamária é essencialmente constituído por tecido conjuntivo fibroso denso e tecido adiposo, enquanto que os lóbulos são revestidos por um estroma específico do tecido mamário, que responde a estímulos hormonais e que se caracteriza pela presença de linfócitos, designado de estroma intralobular [23]. A maior parte das lesões hiperplásicas e neoplásicas da mama tem origem na UDLT, uma vez que é nesta região que se observam mais frequentemente as alterações histopatológicas características destas lesões [23].

Os ductos e os lóbulos são revestidos por duas camadas de células: uma camada mioepitelial contráctil, mais externa, e uma camada luminal epitelial secretora, mais interna (**Figura 3**). A camada mioepitelial encontra-se ligada à membrana basal e possui uma função estrutural de suporte e contractilidade. A camada luminal epitelial é responsável pela produção e secreção do leite [24].

O crescimento e desenvolvimento normais da mama são regulados por uma interacção complexa de vários factores hormonais e de crescimento. Entre estes factores encontram-se hormonas e factores de crescimento segregados pelas próprias células mamárias e hormonas e factores de crescimento produzidos por células estromais que assumem um controlo parácrino das células epiteliais mamárias [25]. Os estrogénios, progesterona, androgénios e os glucocorticóides, a prolactina, as hormonas tiróideas, a insulina, o IGF-1 e o IGF-2, o FGF e o EGF/TGF- α são exemplos destes elementos reguladores [26-30].

A glândula mamária é o único órgão que não está totalmente formado na altura do nascimento, atingindo a sua diferenciação completa aquando da estimulação hormonal da gravidez e da lactação [22, 31, 32]. Os ductos imaturos ramificam-se na puberdade de modo a formar cerca de 15-20 lóbulos. Este processo envolve a multiplicação das células ductais e

a expansão da sua população de células estaminais. Depois da puberdade e até aproximadamente aos 45 anos, o tecido ductal fica sujeito mensalmente a ciclos de proliferação e apoptose. Estes ciclos mensais são controlados principalmente pelo estrogénio e progesterona [1]. No decurso da gravidez, o desenvolvimento das UDLT é acelerado em resposta a hormonas do corpo amarelo, placenta e hipófise de forma a preparar-se para a lactação. De facto, é durante a gravidez que a glândula mamária assume então a sua maturação morfológica e funcional completa, observando-se um aumento do número e tamanho dos lóbulos. Após a lactação, os lóbulos atrofiam e o tamanho total da mama normal diminui consideravelmente. Por fim, na menopausa, os lóbulos e o estroma involuem e numa idade avançada os lóbulos podem mesmo desaparecer na sua maioria, restando somente os ductos, atribuindo à mama um padrão morfológico muito semelhante ao da mama masculina [32].

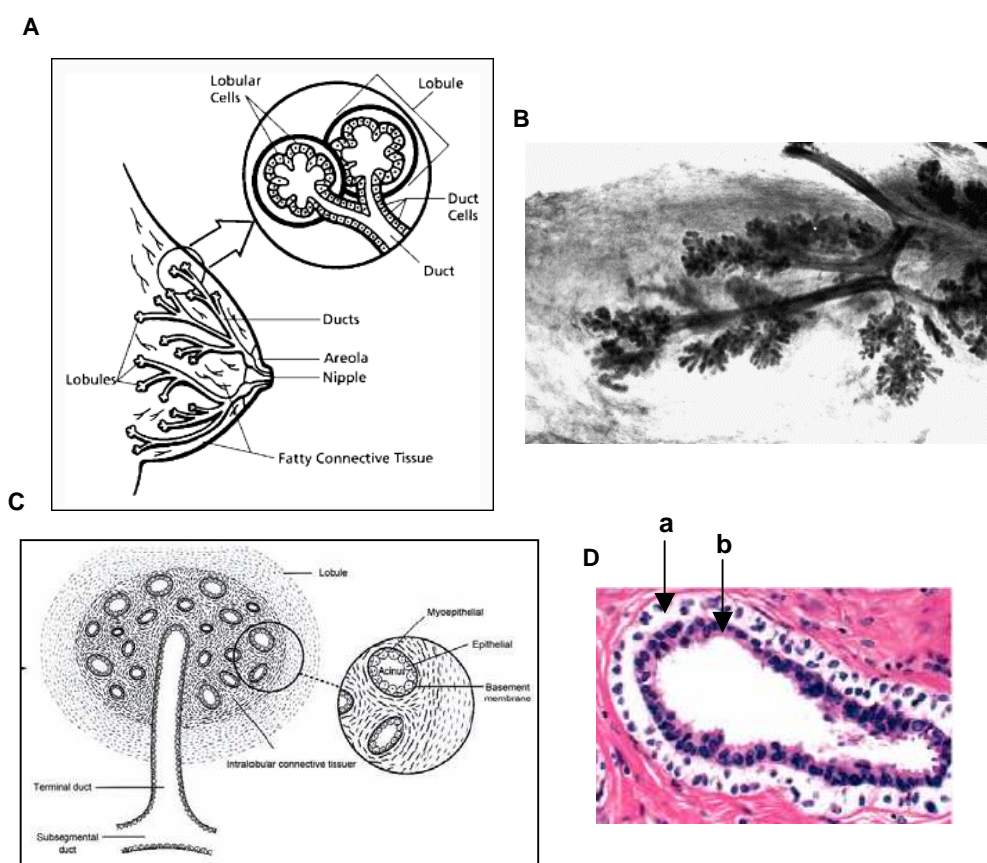


Figura 3 – A glândula mamária. **(A)** Esquema representativo da anatomia básica da mama normal (*Adaptado de American Cancer Society*). **(B)** Preparação de tecido mamário de uma mulher nulípara. Azul de Toluidina (Amplificação 25x) (*Adaptado de Irma Russo and Jose Russo, 1998*). **(C)** Esquema representativo da UDLT, evidenciando a relação espacial entre epitélio, mioepitélio e estroma. **(D)** Imagem histológica do ducto mamário, mostrando a camada de células epiteliais luminais mais interna **(b)** e a camada de células mioepiteliais basais mais externa **(a)**. Coloração H&E; Amplificação 100x. (C e D *Adaptados de Paredes J.P-cadherin – its importance in Carcinogenesis and Progression of Breast Cancer*).

2.3. FACTORES DE RISCO

A incidência de cancro da mama varia substancialmente na presença ou ausência de determinados factores de risco bem estabelecidos, sendo os dois factores mais proeminentes o género e a idade [33]. A incidência de cancro da mama é aproximadamente 100 vezes maior em mulheres do que em homens [33]. Esta aumenta bastante com a idade, sendo cerca de 10 casos por 100 000 mulheres entre os 20 e os 30 anos e mais de 200 por 100 000 nas mulheres com idade superior a 60 anos [33].

2.3.1. Factores demográficos e culturais

Diferentes grupos étnicos apresentam taxas de incidência de cancro da mama divergentes. Os grupos da Ásia-Pacífico têm muito menor incidência do que os grupos da Europa Ocidental, aos quais corresponde a taxa de incidência mais elevada. Dados epidemiológicos revelam que esta elevada incidência nos países Ocidentais está relacionada com um estilo de vida caracterizado por uma dieta altamente calórica, rica em lípidos e proteínas animais, associado à ausência de exercício físico [34].

As mulheres judias, especialmente com uma história familiar de cancro da mama, têm um risco quatro vezes maior de vir a desenvolver esta neoplasia do que uma mulher nas mesmas condições pertencente a qualquer outro grupo étnico [35]. Mutações no gene *BRCA1*, um gene de susceptibilidade no cancro da mama, podem ser encontrada em 1% da população dos Judeus Ashkenazi [35, 36].

Estudos de populações migratórias têm vindo a demonstrar que quando um grupo de baixo risco migra para regiões de alto risco, a sua incidência aumenta rapidamente, aproximando-se das taxas de incidência da população para a qual migrou num período de uma a duas gerações [37].

2.3.2. Factores endócrinos e reprodutivos

Numerosos estudos sugerem uma forte ligação entre os estrogénios e o desenvolvimento de cancro da mama. Certas características, relacionadas com a história reprodutiva da mulher, como menarca precoce, menopausa tardia, gravidezes tardias e em pequeno número, estão associadas com um aumento do tempo de exposição de uma mulher ao longo da sua vida aos estrogénios. Esta exposição prolongada, em conjunto com um longo período de ciclos de proliferação, leva a um aumento da probabilidade de ocorrência de

alterações génicas. Uma outra explicação para a implicação dos estrogénios no cancro da mama, relaciona-se com a própria estrutura desta hormona. Os metabolitos dos estrogénios, em particular os difenólicos, podem tornar-se parcialmente oxidados a semiquinonas, as quais possuem a capacidade de reagir com macromoléculas como o DNA e induzir mutações, bem como iniciar um processo em que são geradas espécies de oxigénio altamente reactivas. Adicionalmente, muitos genes envolvidos na biossíntese e metabolismo dos estrogénios apresentam polimorfismos, supondo-se assim, neste caso, uma interacção significativa entre os genes e o ambiente.

2.3.3. História familiar

Aproximadamente um terço das mulheres com cancro da mama tem um ou mais parentes em primeiro grau com esta neoplasia maligna [38]. Cerca de 5-10% dos casos de cancro da mama resultam de mutações germinativas hereditárias em genes de susceptibilidade de cancro da mama, como o *BRCA1* e *BRCA2*. Estima-se que 90% dos cancros de mama hereditários sejam causados por mutações nestes dois genes supressores tumorais, envolvidos na regulação transcripcional e na manutenção da integridade genómica. As mutações nos genes *BRCA* conferem um risco cumulativo de 56-84% de cancro da mama e de 15-45% de cancro do ovário. Mutações no *BRCA1* estão associadas a famílias com cancro da mama e do ovário e raramente a famílias com cancro da mama masculino [39], enquanto que mutações no *BRCA2* estão também associadas a famílias com cancro da mama masculino [40].

2.4. PERFIS DE EXPRESSÃO GÉNICA

A classificação histológica actual e o sistema de estadiamento do cancro da mama não são ideais, uma vez que pacientes com tipos de tumores e estadios da doença semelhantes têm diferentes prognósticos e respostas à terapia [41, 42].

Variações nos programas de transcrição contribuem para muita da diversidade biológica das células tumorais [41-44]. Estudos recentes por *microarrays* têm revelado que os tumores da mama podem ser classificados em subtipos específicos, distintos pelos seus padrões de expressão génica, o que coloca à disposição um conjunto de características moleculares diferentes para cada tumor e que constitui a base para uma taxonomia molecular do cancro da mama [21, 42, 44, 45]. Assim, Charles Perou e colaboradores distinguiram

quatro grupos de tumores correspondentes a diferentes características moleculares da biologia celular do epitélio mamário: (i) *ERα*-positivo/luminal, (ii) *HER2*-positivo/*ERα*-negativo, (iii) *ERα*-negativo/basal e (iv) tumores '*normal-like*'. Uma importante implicação desta classificação é a identificação de pelo menos dois subtipos de carcinomas da mama clinicamente designados de 'ER-negativos', os basais e os *HER2*-positivos, os quais podem ter que ser tratados como doenças distintas [44, 46] (**Figura 4**).

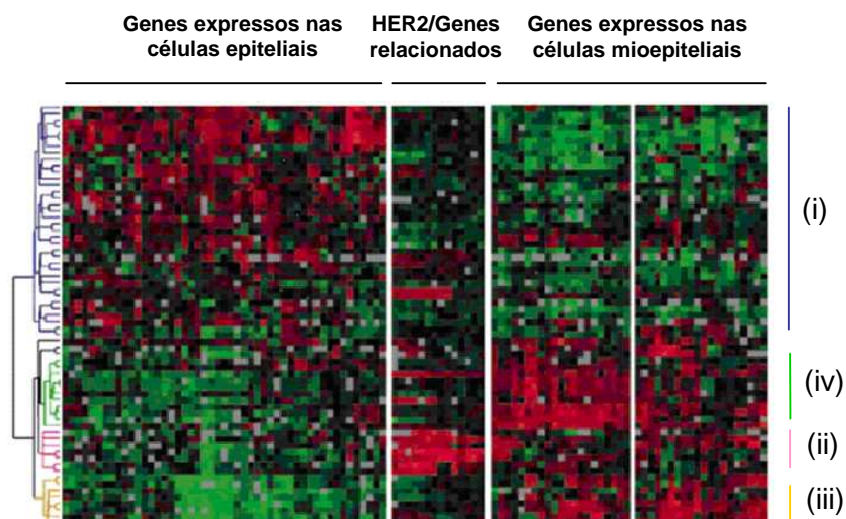


Figura 4 – Perfis de expressão génica do cancro da mama. Estudos por *microarrays* têm vindo a permitir distinguir os tumores de mama em quatro subtipos moleculares distintos: (i) *ERα*-positivo/luminal, (ii) *HER2*-positivo/*ERα*-negativo, (iii) *ERα*-negativo/basal e (iv) tumores '*normal-like*'. (Adaptado de Perou C. M. et al., 2000)

(i) *ERα*-positivo/luminal

Este grupo representa cerca de 70% dos carcinomas da mama, caracterizados por expressarem níveis elevados de vários genes característicos das células luminais da mama, por um prognóstico favorável e por responderem à terapia endócrina, com o tamoxifeno e inibidores da aromatase [47]. Alguns destes genes parecem ser co-regulados pelo *ERα* [42].

(ii) *HER2*-positivo/*ERα*-negativo

Estes tumores apresentam uma sobre-expressão do oncogene *HER2*, baixos níveis de expressão do *ERα* e de vários outros genes associados aos tumores do tipo basal, representando cerca de 15-30% dos cancros da mama [41, 44, 48]. Este subtipo de tumores

está associado a um curto tempo de sobrevivência [41], tendo no entanto uma terapia dirigida, o anticorpo monoclonal Trastuzumab.

(iii) ER α -negativo/basal

Estes tumores, que representam cerca de 2-18% dos carcinomas invasivos da mama, são caracterizados pela expressão de um grupo de genes característico das células basais/mioepiteliais. Este grupo de genes, relacionados com a regulação do ciclo celular, invasão, metastização e angiogénese, como os genes que codificam a CK14, a integrina-4, a laminina e a P-caderina, estão associados a tumores da mama mais agressivos, para os quais não existe actualmente uma terapia dirigida [42, 49]. Adicionalmente, estes tumores não expressam ER α nem genes que são normalmente co-expressos com este receptor [44].

(iv) Tumores 'normal-like'

Neste grupo são incluídos tumores com perfil de expressão génica semelhante ao do tecido mamário normal, bem como tumores com elevada expressão de genes característicos das células basais/mioepiteliais e adiposas e baixa expressão de genes característicos das células luminais epiteliais [44].

2.5. FACTORES DE PROGNÓSTICO E PREDICTIVOS

A heterogeneidade biológica, a crescente incidência e a elevada taxa de mortalidade do cancro da mama justificam as tentativas de se identificarem elementos que permitam melhorar a compreensão do comportamento biológico e, consequentemente, elementos que permitam identificar pacientes com risco de recidiva e metastização à distância (factores prognósticos), bem como seleccionar pacientes susceptíveis a terapêuticas específicas (factores predictivos).

2.5.1. Envolvimento dos gânglios linfáticos

O envolvimento dos gânglios linfáticos é o factor de prognóstico do cancro da mama com maior impacto, sendo relevante a presença de metástases, bem como o número de gânglios envolvidos. A presença de metástases nos gânglios linfáticos está associada a uma redução da sobrevida aos 10 anos. Estudos com um elevado número de pacientes têm vindo a associar uma pequena redução da sobrevida e tempo livre de doença à existência de micrometástases, no entanto, o seu significado clínico, bem como o de células tumorais isoladas nos gânglios linfáticos, ainda é controverso [50].

2.5.2. Tamanho do tumor

O tamanho do tumor constitui um factor de prognóstico independente e também de elevado impacto, sendo que quanto maior o tamanho do tumor maior a probabilidade de surgirem clones com a capacidade de metastização e, consequentemente, pior é o prognóstico. Tumores maiores que 3 cm, apresentam uma taxa de recidiva elevada e requerem terapia adjuvante [51].

2.5.3. Grau histológico

O grau histológico consiste num sistema de pontuação que divide os tumores em três graus distintos, tendo em consideração a sua arquitectura tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico: Grau I – bem diferenciado, Grau II – moderadamente diferenciado e Grau III – pouco diferenciado. Um grau histológico superior corresponde a um pior prognóstico. Este factor prognóstico tem uma correlação significativa com a sobrevida e com o tempo livre de doença [51].

2.5.4. Receptores hormonais

Os receptores de estrogénios e progesterona, para além de serem indicadores da diferenciação dos tumores, constituem um importante factor predictivo. Os tumores hormono-dependentes, positivos para os dois receptores, representam cerca de 80% do total de tumores da mama e estão associados a uma lenta progressão, boa diferenciação e melhor

prognóstico [51, 52]. Cerca de 70 – 80% destes tumores respondem ao tratamento com anti-estrogénios. Recentemente, foi demonstrado que casos ER-positivos/PR-positivos respondem melhor ao tamoxifeno, especialmente em recidivas, enquanto que casos ER-positivos/PgR-negativos desenvolvem mais facilmente resistência a este anti-estrogénio [50].

2.5.5. HER2

Cerca de 40-60% dos carcinomas ductais *in situ* e 15-30% dos carcinomas invasivos da mama, apresentam sobre-expressão do receptor de tirosina cinase HER2. Aproximadamente 90% destes casos, estão associados a uma amplificação do gene [53]. A sobre-expressão de HER2 correlaciona-se com a resistência à terapia com anti-estrogénios e à quimioterapia. Existe, no entanto, actualmente uma terapia dirigida para este tipo de tumores, que consiste num anticorpo monoclonal humanizado (Trastuzumab) que se liga à porção extracelular do receptor, bloqueando a proliferação celular e induzindo a apoptose das células tumorais [52, 54].

2.5.5. Outros factores

O índice proliferativo constitui também um factor prognóstico, correlacionando-se com a sobrevida e o tempo livre de doença, e um factor predictivo, sendo um indicador da resposta à quimioterapia [55, 56]. A contagem dos vasos neoformados (angiogénese) parece estar também correlacionada com o prognóstico, bem como com a idade da paciente.

Por fim, mutações nos genes *p53*, *PI3K* e amplificação de oncogenes que codificam as proteínas c-Myc, ciclina D1 e EGFR são também actualmente considerados marcadores de prognóstico e predictivos do cancro da mama [50].

3. METILAÇÃO DO DNA NO CANCRO DA MAMA

3.1. O PROCESSO DE METILAÇÃO EM MAMÍFEROS

A metilação do DNA, a forma mais importante de regulação epigenética nas células dos mamíferos, consiste na adição covalente de um grupo metilo à citosina na posição 5', predominantemente nos dinucleótidos CpG (**Figura 5**) [57-59]. Esta alteração epigenética é hereditária, no entanto, ao contrário das alterações genéticas, esta não altera a sequência de nucleótidos, sendo potencialmente reversível [60, 61].

Numa nova cadeia de DNA sintetizada, os resíduos de citosina são metilados pela DNA metiltransferase-1 (DNMT1) [62, 63], que transfere um grupo metilo da S-adenosilmetionina para a cadeia filha, usando um molde de DNA hemimetilado de forma a manter os padrões de metilação do DNA durante a divisão celular nos mamíferos.

No genoma humano, cerca de 70-80% dos locais CpG estão metilados [64-66]. Estes dinucleótidos CpG não estão distribuídos arbitrariamente ao longo do genoma, estando frequentemente agrupados em ilhas CpG, regiões ricas nestes dinucleótidos. Estas ilhas, com um tamanho de 0.5-3 Kb, ocorrem em média em cada 100 Kb no genoma e estão muitas vezes presentes na área do promotor dos genes [66]; aproximadamente metade do número total de genes humanos contém ilhas CpG [65].

A metilação tem um papel em diversas funções como o *imprinting* genómico [67, 68], inativação do cromossoma X [69, 70], desenvolvimento normal [71, 72], repressão da transcrição génica [73-75] e supressão de sequências de DNA parasitas [76].

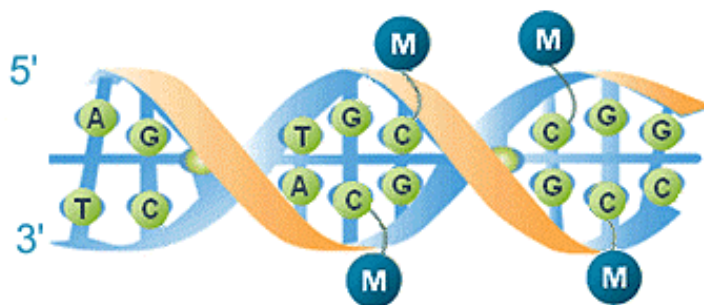


Figura 5 – Processo de metilação de citosinas nos mamíferos. O processo de metilação consiste na adição covalente de grupos metilo às citosinas na posição 5' nos dinucleótidos CpG. (Adaptado de www.oncomethylome.com)

3.2. HIPERMETILAÇÃO E SILENCIAMENTO GÉNICO

O silenciamento da transcrição génica pela hipermetilação do DNA no promotor de um gene, constitui uma das diversas consequências do processo de metilação do DNA em mamíferos e um mecanismo genético alternativo para inactivação de genes no cancro [77, 78]. Este silenciamento é causado por alterações na conformação da cromatina, que levam à ligação de proteínas específicas ao DNA metilado, assim como à diminuição da afinidade de alguns factores de transcrição para os locais CpG metilados [78]. De facto, as alterações epigenéticas parecem estar envolvidas na progressão neoplásica, tanto pela repressão transcripcional da expressão de genes supressores de tumor, como pelo aumento da taxa de mutações [77, 78]. Se o promotor de um gene supressor de tumor é hipermetilado, a expressão do gene associado é silenciada e este evento dá origem a uma célula com vantagem de crescimento [59] (**Figura 6**).

No cancro da mama pode-se observar a hipermetilação e silenciamento de diferentes tipos de genes. Alguns dos mais importantes são genes inibidores do ciclo celular (*p16^{ink4a}*); reparadores do DNA (*BRCA1*); genes que codificam proteínas que ligam o *BRCA1* (*SRBC*), tirosina cinases (*SYK*), enzimas metabólicas (*GSTP1*) e receptores de estrogénios e progesterona (*ER*, *PR*); genes envolvidos na adesão celular e no processo de metastização (*CDH1*/E-caderina, *CDH13*/H-caderina) e na histona/proteína metiltransferase (*RIZ1*); e genes pró-apoptóticos (*TMS1*) [79, 80].

Uma vez que a metilação aberrante do DNA está implicada na patogénese molecular do cancro, podendo ser um evento que ocorre nas etapas iniciais da tumorigénese, a identificação dos genes metilados providencia potenciais alvos para a detecção/monitorização, bem como para a terapia do cancro.

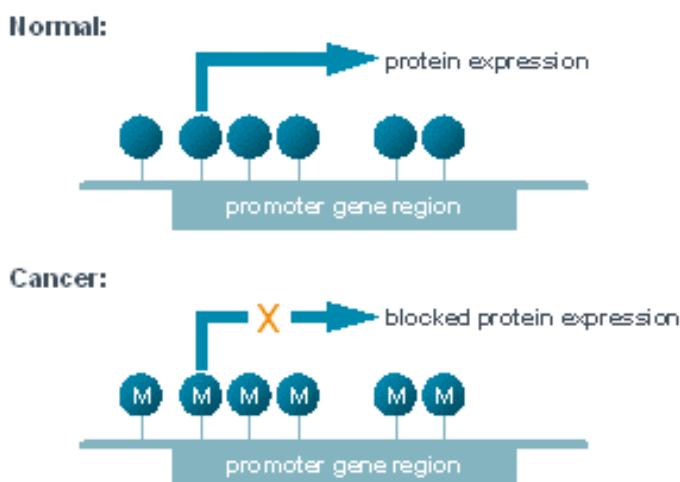


Figura 6 – Hipermetilação e silenciamento génico. Quando uma ilha CpG, localizada na região do promotor de um gene, é hipermetilada, o processo de transcrição é inativado. (Adaptado de www.oncomethylome.com)

3.2.1. Hipermetilação e silenciamento do ER e do PR

Dois dos genes que se encontram hipermetilados no cancro da mama são os genes que codificam os receptores de estrogénio e de progesterona (*ER* e o *PR*). De facto, numa porção significativa de cancros da mama, a ausência de ER e de PR é o resultado da metilação aberrante das ilhas CpG no promotor dos genes que codificam estas duas proteínas e consequente silenciamento da sua transcrição génica [57, 81-83].

Os receptores de estrogénio e progesterona são membros da superfamília de receptores nucleares que medeiam o efeito dos estrogénios e da progesterona numa variedade de processos fisiológicos, como o crescimento, diferenciação e homeostasia das células eucariotas. A maioria dos cancros da mama é hormono-dependente, sendo que a ligação do estrogénio e da progesterona às formas activas do ER e do PR, respectivamente, induz o crescimento dos tumores da mama ER-positivos/PR-positivos (**Figura 7**). No entanto, cerca de um terço dos cancros da mama são ER-negativos/PR-negativos aquando do diagnóstico e uma fracção significativa de tumores da mama, inicialmente ER-positivos perdem o ER durante a progressão tumoral [84]. A perda da expressão do ER leva a um crescimento tumoral que deixa de estar sob o controlo dos estrogénios e, assim, à ausência de resposta à terapia endócrina, através da redução dos níveis de estrogénios ou da alteração da actividade do ER. Na medida em que a expressão de PR requer a activação transcripcional de ER, a expressão de PR nos carcinomas ER-positivos é um melhor factor predictivo da resposta à terapia endócrina do que a expressão de ER isoladamente. Os tumores que não podem ser controlados por terapia endócrina são tumores mais agressivos e de pior prognóstico.

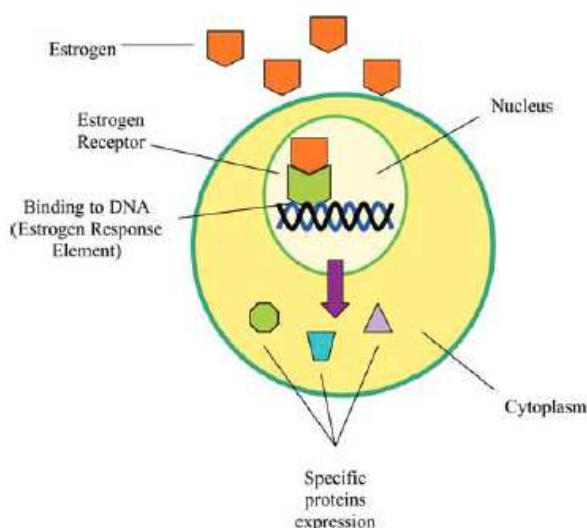


Figura 7 – Activação génica através do receptor de estrogénio. Normalmente o ER encontra-se no núcleo. Quando uma molécula de estrogénio entra na célula liga-se a este receptor e o complexo estrogénio-receptor liga-se por sua vez a locais específicos do DNA (ERE – *Estrogen Response Elements*) perto de genes que são controlados pelo estrogénio. Este mecanismo activa a transcrição génica e a síntese de proteínas específicas. (*Adaptado de Giacinti L. et al. 2006*)

O tratamento de linhas celulares de cancro da mama ER-negativas/PR-negativas com 5-aza-2'-deoxicitidina, um agente desmetilante, leva a uma desmetilação parcial das ilhas CpG nos promotores do *ER* e de *PR*, re-expressão do mRNA dos *ER* e *PR* e síntese das proteínas ER e PR funcionais [57, 83, 85]. Adicionalmente, a inibição da DNMT1 através de oligonucleotídeos *antisense* causa também a re-expressão do gene *ER* e a restauração da resposta a estrogénios em células de cancro da mama ER-negativas [86]. Por fim, a combinação de agentes desmetilantes com inibidores de Histonas Desacetilases (HDAC) – enzimas que desacetilam locais proteicos específicos influenciando desta forma o processo de transcrição – têm um efeito sinérgico na re-expressão de ER, em células de cancro da mama ER-negativas, e a sua combinação com drogas hormonais e agentes quimioterápicos normalmente usados pode constituir uma nova possibilidade na optimização do tratamento do cancro da mama [87].

4. FAMÍLIA DAS ADAMTS

As ADAMTS (Desintegrinas e Metaloproteases com motivos Trombospondina) são um grupo de proteases identificadas em mamíferos e invertebrados. Após a publicação do primeiro membro da família, ADAMTS-1, em 1997 [88], a sequenciação completa do genoma humano revelou 19 membros desta família de proteases.

As ADAMTS estão intimamente relacionadas com as proteinases ADAM (Desintegrinas e Metaloproteases) que participam na clivagem do ectodomínio ou na activação de diversas moléculas da superfície celular, incluindo receptores de factores de crescimento e moléculas de adesão [89]. Contudo, ao contrário das ADAM que, com excepções pontuais, são proteínas transmembranares, as ADAMTS são proteínas de secreção, algumas das quais se ligam à matriz extracelular (ECM) [89, 90].

As ADAMTS agrupam-se em pequenas classes, o que sugere uma evolução por ‘*exon shuffling*’ e duplicação dos genes ancestrais. As classes são organizadas de acordo com a sua estrutura modular, sequência proteica, estrutura do gene e, possivelmente, preferência por determinados substratos (**Figura 8**).

4.1. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL

No que diz respeito à sua organização estrutural, as ADAMTS compreendem um domínio metaloprotease, homólogo à região metaloprotease das ADAM, ligado a um domínio não-enzimático com uma estrutura altamente conservada e que contém pelo menos um motivo trombospondina –1 (TSR), característico das proteínas de matriz extracelular (**Figura 8**). De facto, as ADAMTS, após a sua secreção, ligam-se a componentes da matriz extracelular, como a heparina e o sulfato de heparano, sendo tal ligação mediada, precisamente, pelos seus motivos trombospondina.

A estrutura molecular das ADAMTS pode ser dividida em módulos, domínios e motivos. Do N-terminal para o C-terminal os domínios e motivos das ADAMTS são:

- (i) **Pró-domínio:** varia geralmente de 220-300 aminoácidos, excepto no caso de ADAMTS-13, em que é invulgarmente pequeno (74 aminoácidos). Contém 1-3 resíduos de cisteína e pelo menos um motivo de consenso de clivagem da furina.

Pensa-se que as formas zimogénio, ou seja os precursores inactivos, das ADAMTS são clivadas intracelularmente no local de clivagem da furina mais próximo do C-terminal, encontrando-se as proteínas secretadas na sua forma madura;

- (ii) **Domínio catalítico:** possui um elevado grau de homologia entre as diferentes ADAMTS e contem a sequência de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH, na qual o zinco catalítico é coordenado pelos três resíduos de histidina [91, 92];
- (iii) **Domínio semelhante a desintegrina:** é constituído por 60-90 aminoácidos com 25-45% de similaridade com as desintegrinas do veneno de cobra, no entanto sem o seu arranjo de cisteína canónico. Até à data não foi publicada nenhuma evidência de que este domínio possua efectivamente uma actividade desintegrina;
- (iv) **TS repetido (TSR):** ao contrário das ADAM, as ADAMTS possuem um TSR tipo 1 homólogo ao TSR tipo 1 das trombospondinas 1 e 2 [93]. O TSR central é muito semelhante em todas as ADAMTS e compreende entre 48-54 aminoácidos;
- (v) **Domínio rico em cisteína (CDR):** constitui uma sequência bem conservada entre as ADAMTS, contendo 10 resíduos de cisteína;
- (vi) **O espaço:** um domínio de tamanho variável que pode ser dividido numa metade N-terminal em que vários aminoácidos hidrofóbicos são conservados e numa metade C-terminal extremamente variável. Este é o domínio das ADAMTS que apresenta menor homologia;
- (vii) **Um ou mais TSRs C-terminal:** os TSR a jusante possuem uma sequência muito mais variável que o TSR central. Alguns TSR em determinadas ADAMTS podem ainda conter um motivo BBXB que liga a heparina ou um motivo CVSTCG que liga o receptor de superfície celular CD36;
- (viii) **Módulos C-terminal:** quatro tipos de módulos C-terminal foram encontrados *downstream* dos TSR de algumas ADAMTS. ADAMTS-9 e -20 possui um módulo encontrado somente no seu ortólogo GON-1 que contém 10 cisteínas conservadas e vários outros aminoácidos conservados. ADAMTS -2, -3, -10, -14 -17 e -19 contêm um domínio PLAC, que é encontrado em algumas convertases pró-proteína. Finalmente ADAMTS-13 é o único membro desta família que contem domínios CUB, existindo dois localizados no seu C-terminal.

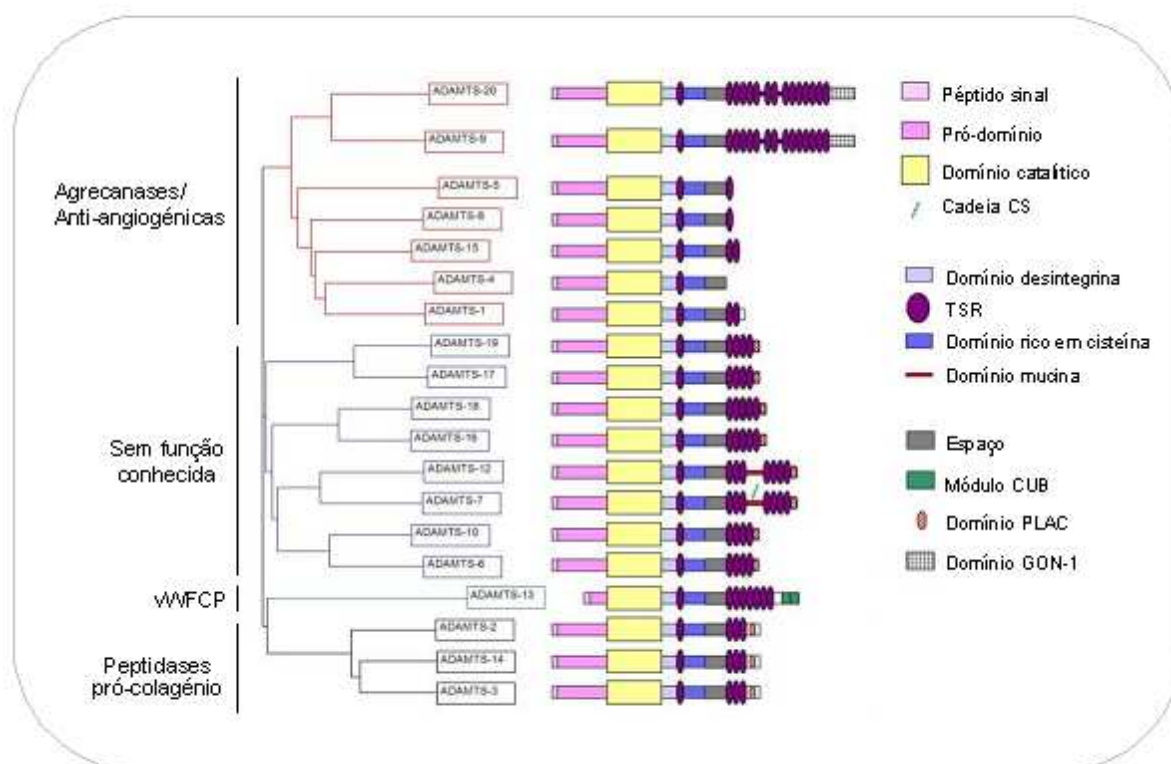


Figura 8 – Relação estrutural e evolucionária das diferentes ADAMTS.
(Adaptado de Gavin C Jones. et al. 2005)

4.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS

Com base nas suas funções biológicas, as ADAMTS podem ser divididas nos seguintes grupos: (i) aminopeptidases pró-colagénio, que estão envolvidas no processamento dos pró-colagénios a colagénios [94-97]; (ii) agrecanases, que clivam o agrecano em ligações específicas, resultando na perda das propriedades compressivas da cartilagem; (iii) anti-angiogénicas, que possuem a capacidade de inibir a angiogénese induzida pelo VEGF e suprimir a vascularização induzida pelo FGF-2 [98]; (iv) GON-ADAMTS, relacionadas com o gene *GON1*, que tem um papel essencial no desenvolvimento gonadal em *C.elegans* [99] e, por fim, (v) ADAMTS-13, o membro isolado desta família que cliva o factor von Willebrand em tamanhos óptimos para a sua posterior coagulação e está presente no plasma, plaquetas e células endoteliais vasculares [100-103]. Importa ainda referir que vários membros desta família de proteases recentemente identificados continuam sem ser colocados num grupo específico, uma vez que os seus substratos não são ainda conhecidos (**Figura 8**).

4.3. EXPRESSÃO DAS ADAMTS

O mRNA dos ADAMTS parece estar expresso num grande e variável grupo de tecidos humanos adultos, sendo a sua expressão em tecidos fetais mais limitada (**Tabela 1**).

Porter e colaboradores estudaram o perfil de expressão de mRNA dos 19 membros da família *ADAMTS* por PCR em tempo real quantitativo em cancro da mama e da próstata. Comparativamente com a mama normal, observaram que 11 *ADAMTS* se encontram, de uma forma estatisticamente significativa, desregulados em carcinomas da mama invasivos. *ADAMTS*-1, -3, -5, -8, -9, -10 e -18 estão 40-90% sub-regulados, enquanto que *ADAMTS*-4, -6, -14 e -20 estão 80-2000% sobre-regulados. *ADAMTS*-15 não apresenta uma diferença de expressão estatisticamente significativa entre os carcinomas invasivos e a mama normal, no entanto, pacientes com tumores que apresentam baixos níveis deste *ADAMTS* têm um tempo de sobrevida curto [104]. Na mama normal, a expressão parece ser predominantemente nas células mioepiteliais ou no estroma e raramente nas células epiteliais luminais [104]. Este padrão de expressão, sugere um possível papel destas proteases no controlo da remodelação da membrana basal na mama normal. *ADAMTS*-13 e -20 encontram-se sub-regulados em carcinomas da próstata comparativamente com amostras de hiperplasia da próstata, bem como tecido de próstata normal (S. Porter *et al.*, trabalho não publicado).

Masui e colaboradores descreveram a sub-expressão de mRNA de *ADAMTS*-1 em cancros pancreáticos e carcinomas hepatocelulares [105]. Elevados níveis deste gene estão também presentes em situações de cancro pancreático metastático e estes pacientes apresentam pior prognóstico após cirurgia, o que sugere que de facto este gene possa ter um papel positivo na progressão do cancro pancreático pela formação de metástases nos gânglios linfáticos e pela invasão local. Assim, tal como as MMP, as ADAMTS podem ter acções múltiplas, talvez mesmo opostas, em fases particulares da progressão tumoral.

Tabela 1 – Expressão das ADAMTS em tecidos humanos. (nd, not detected in tissues examined; nt, not tested. Ac, adrenal cortex; Am, adrenal medulla; Ao, aorta; Bl, bladder; Bo, bone; Br, brain; Bs, breast; Co, colon; Cx, cervix; En, endothelium; Ht, heart; In, intestine; Ki, kidney; Li, liver; Lu, lung; Mu, skeletal muscle; Oe, oesophagus; Ov, ovary; Pc, pancreas; Pl, placenta; Pr, prostate; Re, retina; Sk, skin; Sl, spleen; Sm, submaxillary gland; Sp, spinal cord; St, stomach; Te, tendon; Th, thyroid; Ty, thymus; Ts, testis; Ut, uterus). (*Adaptado de Porter et al. 2005*)

Gene name	Fetal tissue	Normal adult tissue	Malignant adult tissue
ADAMTS-1	Ki, Lu	Ht, Pl, Li, Mu, Ki, Th, Am, Ac, St, Ut, Bl, Cx, Ao, Co, Oe, Ov, Pr, Sp	Cell lines only
ADAMTS-2	Nt	Ao, Bo, Sk, Te, Bl, Re, Ki, Lu, In, Li, Mu	nt
ADAMTS-3	Nt	Pl, Lu, Br, Ht, Sk	nt
ADAMTS-4	Nt	Bl, Br, Ov, Ht, Mu, Ut, St, Sp	nt
ADAMTS-5	Nt	Bl, Cx, Oe, Pl, Ut	nt
ADAMTS-6	Nt	nd	nt
ADAMTS-7	Nt	Ht, Mu, Ki, Pc, Br, Li	nt
ADAMTS-8	Br, Lu, Ki	Lu, Ht, Pl, Br	Cell lines only
ADAMTS-9	Br, Ht, Ki, Li, Lu, Mu, Sl, Ty	Ht, Pl, Lu, Mu, Ki, Pc, Ov, Co	nt
ADAMTS-10	Nt	Pc, Ht, Br, Lu, Pl, Li, Ki	Cell lines only
ADAMTS-12	Lu	nd	St carcinoma
ADAMTS-13	Li	Pr, Br, Li, Pl, Ht, Mu	nd
ADAMTS-14	Lu	Pr, Br, Li, Re, Lu, Pl	Ki, Bs carcinoma
ADAMTS-15	Li, Ki	nd	nd
ADAMTS-16	Lu, Ki	Br, Ov	nd
ADAMTS-17	Lu	Ov	nd
ADAMTS-18	Lu, Ki	Pr, Br, En, Sm	nd
ADAMTS-19	Lu	nd	Osteosarcoma
ADAMTS-20	Nt	Ts, Pr, Ov, Ht, Pl, Lu, Pc	Br, Co, Bs carcinoma

4.4. REGULAÇÃO DAS ADAMTS

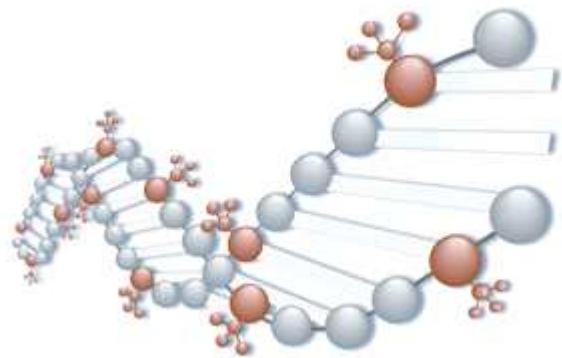
Actualmente, sabe-se pouco sobre a regulação das ADAMTS. Apesar disso, existem evidências que várias ADAMTS são reguladas por factores de crescimento, hormonas e citocinas inflamatórias. Entre estas moléculas reguladoras encontram-se o TGF- α [94], hormonas da tiróideas, nomeadamente a tri-iodotironina (T3) [106], paratormona [107], hormona luteinizante, hormona gonadotrófica coriónica humana e progesterona [108, 109]. As TIMP, inibidores efectivos das MMP, inibem também as ADAMTS, no entanto, de uma forma mais selectiva [110-113]. Por fim, tem vindo a ser sugerido que a papilina, uma glicoproteína essencial da matriz extracelular, identificada em mamíferos e em invertebrados, tem também um papel na modulação dos membros desta família de proteases [114].

4.5. ADAMTS-8

A ADAMTS-8 é codificada por um gene localizado no braço longo do cromossoma 11 (11q25) [98, 115], uma região que frequentemente sofre deleção nos cânceros da mama [116] e na qual vários autores postulam a existência de um gene supressor de tumor [116-118]. No entanto, a presença de *ADAMTS-8* foi testada em várias linhas celulares de câncer da mama, não se encontrando nenhuma evidência de perda de heterozigotia por Southern blotting, bem como de deleção do seu *locus* por análise citogenética [98]. A deleção da região 11q25 sugere que *ADAMTS-8* possa ser um gene supressor tumoral candidato no câncer da mama. Esta hipótese é suportada pelas suas capacidades de supressão da vascularização induzida por *FGF-2* no *Corneal Pocket Assay*, de inibição da angiogénese induzida por *VEGF* no *Chick Chorioallantoic Membrane Assay* [119], bem como de bloqueio da proliferação de células endoteliais [98]. A resposta anti-angiogénica induzida por ADAMTS-8 é maior do que a resposta induzida por TSP-1 ou pela endostatina, sendo que a sua actividade inibitória parece ser mediada pelos seus motivos trombospondina, que são uma característica das TSP-1 e TSP-2, proteínas de secreção multifuncionais com a capacidade de inibir a angiogénese [120]. O mecanismo pelo qual ADAMTS-8 inibe a proliferação de células endoteliais parece ser específico, uma vez que ADAMTS-8 não suprime o crescimento de músculo liso ou fibroblastos [98].

No que diz respeito à sua expressão, *ADAMTS-8* é expresso numa variedade de tecidos humanos normais, como o pulmão fetal e adulto, aorta, cérebro, coração fetal, apêndice, bexiga e placenta (**Tabela 1**) [98, 121]. A sub-regulação significativa de *ADAMTS-8* foi descrita em carcinomas do pulmão de não pequenas células, bem como em neoplasias do sistema nervoso central, sendo que no primeiro caso a hipermetilação do seu promotor parece ser o mecanismo de silenciamento desta protease, enquanto que no segundo parece existir um mecanismo alternativo da regulação da sua expressão [119, 122, 123]. *ADAMTS-8* é também significativamente sub-regulado em carcinomas da mama, comparativamente com tecido mamário não neoplásico [104, 124], sendo o mecanismo subjacente a esta sub-regulação ainda desconhecido. A possível existência de um gene supressor de tumor no câncer da mama ainda não identificado, na região de localização de *ADAMTS-8* em conjunto com a sub-expressão de *ADAMTS-8* em carcinomas da mama, indiciam o valor de futuros estudos de forma a demonstrar se *ADAMTS-8* constitui ou não um gene supressor de tumor no tecido mamário.

OBJETIVOS

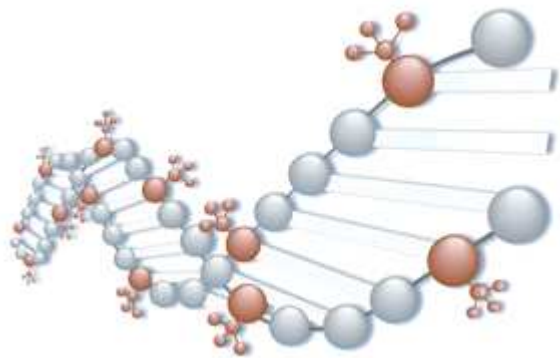


OBJECTIVOS

De forma a clarificar o papel de ADAMTS-8 no cancro da mama, iniciou-se o presente estudo com os seguintes objectivos:

- Avaliar a expressão de *ADAMTS-8* num painel de linhas celulares de cancro da mama representativas de diferentes subtipos de carcinomas da mama
- Estudar o efeito da metilação do DNA na expressão de *ADAMTS-8* neste material.

MATERIAL E MÉTODOS



MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Estudaram-se sete linhas celulares humanas representativas de diferentes subtipos de cancro da mama (**Tabela 2**) e tecido mamário não neoplásico obtido no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, Porto, Portugal. Adicionalmente, uma linha celular humana de carcinoma do cólon, a SW480, foi usada como controlo positivo para as diferentes técnicas e ensaios realizados, uma vez que se sabe expressar ADAMTS-8 [98]. As linhas celulares foram mantidas em cultura a 37°C, com 5% de CO₂ em DMEM (Gibco, Invitrogen, Califórnia, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Califórnia, USA).

Tabela 2 – Linhas celulares de cancro da mama representativas de diferentes subtipos de carcinomas da mama.

Linha celular	Subtipo
MCF7/AZ	ERα-positivo/luminal
T47D	ERα-positivo/luminal
ZR-75.1	ERα-positivo/luminal
SK-BR3	ERα-negativo/HER2-positivo
Hs578T	ERα-negativo/basal
MDA-MB-231	ERα-negativo/basal
MCF10A	ERα-negativo/basal

2. MÉTODOS

2.1. DESMETILAÇÃO

As linhas celulares foram desmetiladas pela incubação durante 5 dias com 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de 5-Aza-2'-deoxicitidina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), que reduz o nível de 5-metilcitosina no DNA, tendo-se efectuado culturas em paralelo, incubadas nas mesmas condições com DMSO (o veículo da droga), para servirem como controlo. Após 5 dias de incubação o RNA foi isolado das células.

2.2. EXTRACÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Extraíu-se o mRNA de 4×10^6 células de cada linha celular através do Versagene RNA Purification Kit (Gentra, Minnesota, USA), segundo as condições descritas pelo fabricante. Para a extracção de RNA do tecido mamário não neoplásico congelado fresco, este foi previamente homogeneizado mecanicamente no tampão de lise do kit de extracção usado. Após a extracção, determinou-se a concentração de RNA por espectrofotometria a 260 nm e converteu-se 1 μg desse mesmo RNA em cDNA, usando 1 μM de Oligo (dT) 18 primer (Fermentas, Maryland, USA), 10 U de Rnase Inhibitor (Invitrogen, Califórnia, USA), 0.5 mM de cada dNTP, 4 U de Omniscript Reverse Transcriptase e 1X de Buffer RT (Omniscript Kit – Qiagen, Hilden, Germany), segundo as condições do fabricante num volume total de 20 μL . Incubou-se a mistura de reacção a 37°C durante 60 min e inactivou-se a enzima a 95°C durante 5 min. Por fim, determinou-se a concentração de cDNA obtido por espectrofotometria a 260 nm.

2.3. RT-PCR MULTIPLEX

Realizou-se o estudo semi-quantitativo do mRNA do *ADAMTS-8* em sete linhas celulares humanas de cancro de mama, usando como controlo positivo a linha celular de cancro de cólon SW480. De modo a controlar a qualidade do RNA, a eficiência dos processos

de extracção, de síntese de cDNA e de amplificação, bem como, a comparar os níveis de expressão de *ADAMTS-8* entre as diferentes linhas celulares, estudou-se também a expressão do mRNA do *GAPDH*, um gene *housekeeping*. Para tal, a partir de 100 ng de cDNA de cada linha celular, bem como, do tecido de mama normal, os genes *ADAMTS-8* e *GAPDH* foram amplificados por uma reacção de PCR multiplex através do Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando 0.2 µM dos *primers forward* e *reverse* descritos por Sarah Porter e colaboradores [104] para o *ADAMTS-8*, 0.2 µM dos *primers forward* e *reverse* para o *GAPDH* (**Tabela 3**) e 1x de Master Mix num volume total de 25 µL. A amplificação realizou-se segundo os seguintes parâmetros: activação inicial da enzima a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg, *annealing* a 65°C durante 90 seg e extensão a 72°C durante 90 seg; extensão final a 72°C durante 10 min. Os produtos amplificados foram visualizados num gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio.

Tabela 3 – *Primers* utilizados para a amplificação de *ADAMTS-8* e *GAPDH*.

Primer	Sequência
<i>ADAMTS-8 forward</i>	5'-AGAGGACAGGAAGCAGGACAA-3'
<i>ADAMTS-8 reverse</i>	5'-GGACACAAACCTCTTGCTTCTAGTT-3'
<i>GAPDH forward</i>	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'
<i>GAPDH reverse</i>	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

2.4. WESTERN BLOTTING PARA O ER E O PR

De forma a comparar a expressão do ER e do PR nas linhas celulares a usar nos subsequentes ensaios de PCR em tempo real, realizou-se Western blotting para os dois receptores. Os lisados celulares foram realizados a partir de culturas celulares com uma confluência de cerca de 90%. As células foram lisadas com uma solução de Catenin Lysis Buffer (1% (v/v) Triton X-100 e 1% (v/v) NP-40 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em PBS desionizado) e 1/7 de uma mistura de inibidores de proteases (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas na solução de lise e de inibidores de proteases durante 10 min, a 4°C. Os lisados foram então bem homogeneizados, centrifugados a 14000 rpm durante 10 min e quantificados pelo método de Bradford através do Dc Protein Assay (Bio-Rad, Califórnia, USA). Todas as amostras foram preparadas de forma a ser carregada a mesma quantidade de proteína. Dissolveram-se as proteínas em Laemmli (um tampão que confere à amostra densidade, cor e carga negativa)

com 5% (v/v) 2-β-mercaptoetanol e 5% (v/v) azul de bromofenol e desnaturaram-se as proteínas à temperatura de 95°C durante 10 min.

Os extractos proteicos totais foram então separados num gel de poliacrilamida a 8% a 130 V durante 1 hr 30 min e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) a 25 V durante 30 min no sistema de transferência Trans – blot semi-dry (Bio-Rad, Califórnia, USA). O sucesso da transferência e da presença de proteínas na membrana em quantidades equivalentes foi verificado pela adição do reagente Ponceau (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). As membranas foram depois bloqueadas durante a noite a 4°C por leite a 5% (w/v) em PBS com 0.5% (v/v) de Tween-20, de forma a diminuir as reacções inespecíficas. Para detectar os produtos imunoreactivos, as membranas foram incubadas durante 1hr com os anticorpos primários para ER (Mouse Monoclonal anti-ER - Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK; diluição de 1:50), para PR (Progesterone Receptor – Clone SP2 – Rabbit Monoclonal Antibody, Lab Vision Corporation, USA; diluição de 1:25) e para a actina (Goat clone I-19, Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA; diluição 1:1000), lavadas 4 vezes durante 5 min com PBS contendo 0,5% de Tween 20, incubadas durante 1 hr com os anticorpos secundários (Goat Anti-Mouse IgG – HRP, Santa Cruz Biotechnologies, Califórnia, USA; diluição de 1:1000 e Goat Anti-Rabbit IgG – HRP, Santa Cruz Biotechnologies, Califórnia, USA; diluição de 1:2000) e lavadas novamente 4 vezes durante 5 min com PBS contendo 0,5% de Tween 20. As proteínas específicas foram por fim detectadas por quimioluminescência através do ECL Advance Kit (Amersham Hybond ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) e do sistema de detecção de imagem Chemidoc (Bio-Rad, Califórnia, USA).

2.5. PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO

Com o objectivo de comparar níveis de expressão relativa de *ADAMTS-8* inferiores ao limite de detecção do PCR multiplex, realizou-se uma reacção de PCR em tempo real quantitativo para duas linhas celulares ER-positivas/PR-positivas (MCF7/AZ e T47D) e duas linhas ER-negativas/PR-negativas (MDA-MB-231 e Hs578T). A reacção de PCR foi realizada em triplicado para todas as amostras (500ng de cDNA) numa placa óptica de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, California, USA) com 1X de QuantiTect SYBR Green PCR I Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 0.3 µM dos *primers forward* e *reverse* usados no PCR multiplex num volume final de 25 µL. A amplificação realizou-se no ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Califórnia, USA) segundo os seguintes parâmetros:

activação inicial da enzima a 95°C durante 15 min e 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg e *annealing* a 65°C durante 1min.

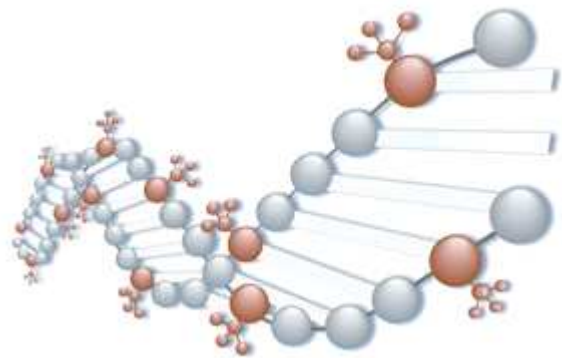
2.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os resultados da reacção de PCR em tempo real foram analisados segundo as indicações descritas pelo fabricante do ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Califórnia, USA). Assim, de modo a determinar as quantidades relativas de mRNA de *ADAMTS-8*, realizaram-se duas rectas padrão, uma para o *GAPDH* e outra para o *ADAMTS-8*, através de 7 diluições seriadas de cDNA da linha SW480. Cada diluição usada para a recta padrão, bem como cada amostra, foram testadas em triplicado. Os valores das concentrações relativas de *GAPDH* e *ADAMTS-8* em cada amostra foram calculados por extrapolação dos *Cycle Threshold* (Ct) na recta padrão [Concentração = f(Ct)] respectiva. Calcularam-se as médias das concentrações dos dois genes para cada amostra e dividiu-se a média da concentração de *ADAMTS-8* pela média da concentração respectiva de *GAPDH* de modo a normalizar as diferenças de mRNA total entre amostras. Os valores de concentração normalizada das linhas celulares foram então convertidos em valores relativos à concentração normalizada da mama normal, considerando os níveis de expressão da mama normal iguais a 1. No caso do PCR em tempo real das linhas desmetiladas, os valores de concentração de *ADAMTS-8* normalizada foram convertidos em valores relativos aos níveis de expressão de *ADAMTS-8* no controlo (linha celular incubada com o DMSO, o veículo da droga), considerando estes iguais a 1.

A especificidade dos produtos de amplificação foi confirmada pela análise de dissociação (curva de *melting*) bem como pela presença de uma banda única de peso molecular específico após electroforese em gel de agarose a 2%.

O teste *t-student* foi usado para a análise estatística dos resultados de avaliação dos níveis de expressão de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. EXPRESSÃO DE *ADAMTS-8* EM LINHAS CELULARES DE CANCRO DA MAMA

1.1. RT-PCR MULTIPLEX

De forma a estudar a expressão de *ADAMTS-8*, realizou-se uma reacção de RT-PCR multiplex. Amplificaram-se os genes *ADAMTS-8* e *GAPDH* em sete linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário não neoplásico, utilizando *primers* que amplificam um fragmento de *ADAMTS-8* de 138 bp e de *GAPDH* de 307 bp. Observou-se que o gene *ADAMTS-8* se encontra sub-expresso em seis das sete linhas de cancro de mama estudadas, relativamente à amostra de tecido mamário não neoplásico. Numa das linhas celulares, a T47D, a expressão de *ADAMTS-8* não foi consistente entre os vários ensaios realizados (Figura 9).

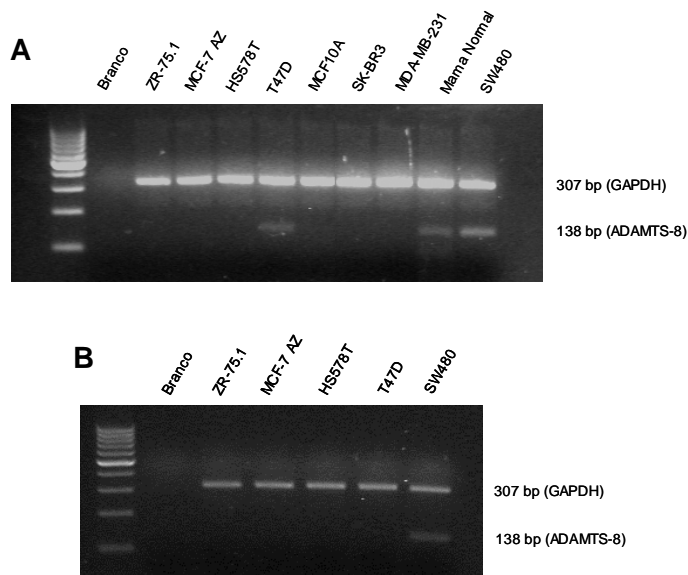


Figura 9 – Expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário não neoplásico. **(A)** *ADAMTS-8* está sub-expresso em seis das sete linhas celulares estudadas relativamente ao tecido de mama normal. A expressão de *ADAMTS-8* na linha T47D é positiva. **(B)** A expressão de *ADAMTS-8* na linha celular T47D é negativa.

1.2. PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO

Com o objectivo de quantificar as diferenças relativas de expressão de *ADAMTS-8* observadas por RT-PCR convencional entre as linhas celulares de cancro da mama e a mama normal, bem como entre linhas celulares provenientes de dois tipos de carcinoma da mama distintos, os carcinomas ER-positivos/PR-positivos e ER-negativos/PR-negativos (**Figura 10A**), realizou-se uma reacção de PCR em tempo real.

Pelos resultados obtidos (**Figura 10B**), verifica-se uma diminuição da expressão de *ADAMTS-8* em todas as linhas celulares comparativamente com a mama normal, sendo esta diminuição estatisticamente significativa ($p = 0,02$). Adicionalmente, entre as diferentes linhas celulares verifica-se uma menor expressão deste gene nas linhas ER-negativos/PR-negativos em relação às linhas ER-positivos/PR-positivos, sendo mesmo que numa das linhas ER-negativos/PR-negativos, a Hs578T, não é possível detectar qualquer expressão de *ADAMTS-8*.

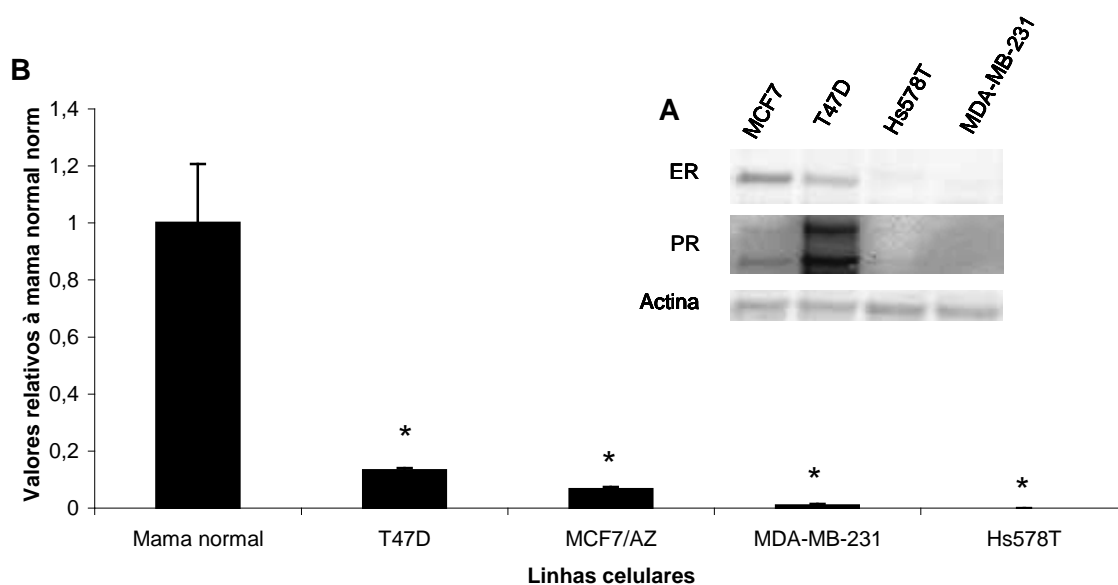


Figura 10 - Expressão do ER e PR nas linhas celulares e quantificação relativa da expressão de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real em linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário normal. **(A)** Confirmou-se a expressão do ER e PR nas linhas celulares MCF-7 e T47D e a sua ausência nas linhas MDA-MB-231 e Hs578T. **(B)** Os resultados de quantificação por PCR em tempo real foram convertidos em relação à mama normal, considerando a sua expressão igual a 1. Todas as linhas celulares apresentam menor expressão de *ADAMTS-8* relativamente ao tecido mamário não neoplásico, sendo a diferença estatisticamente significativa. Adicionalmente, as linhas celulares ER-negativas/PR-negativas expressam níveis inferiores de *ADAMTS-8* em comparação com as linhas ER-positivas/PR-positivas. * (Diferente da mama normal).

2. EFEITO DA METILAÇÃO NA EXPRESSÃO DE *ADAMTS-8*

De modo a perceber se a metilação está envolvida na sub-expressão de *ADAMTS-8* no cancro da mama, pela hipermetilação do promotor de *ADAMTS-8* ou, de forma alternativa, por uma regulação indirecta via hipermetilação do promotor do *ER* e/ou *PR*, as quatro linhas celulares utilizadas no PCR em tempo real foram desmetiladas e a expressão de *ADAMTS-8* reavaliada por PCR em tempo real.

Os resultados, apresentados na **Figura 11**, mostram que, após desmetilação, não ocorre qualquer alteração nos níveis de mRNA de *ADAMTS-8* nas linhas ER-positivas/PR-positivas. Por outro lado, numa das linhas ER-negativas/PR-negativas, a MDA-MB-231, estes níveis aumentam, sendo esse aumento estatisticamente significativo ($p = 0,01$). Na linha Hs578T, não se verifica qualquer alteração da expressão de *ADAMTS-8* após tratamento com o agente desmetilante.

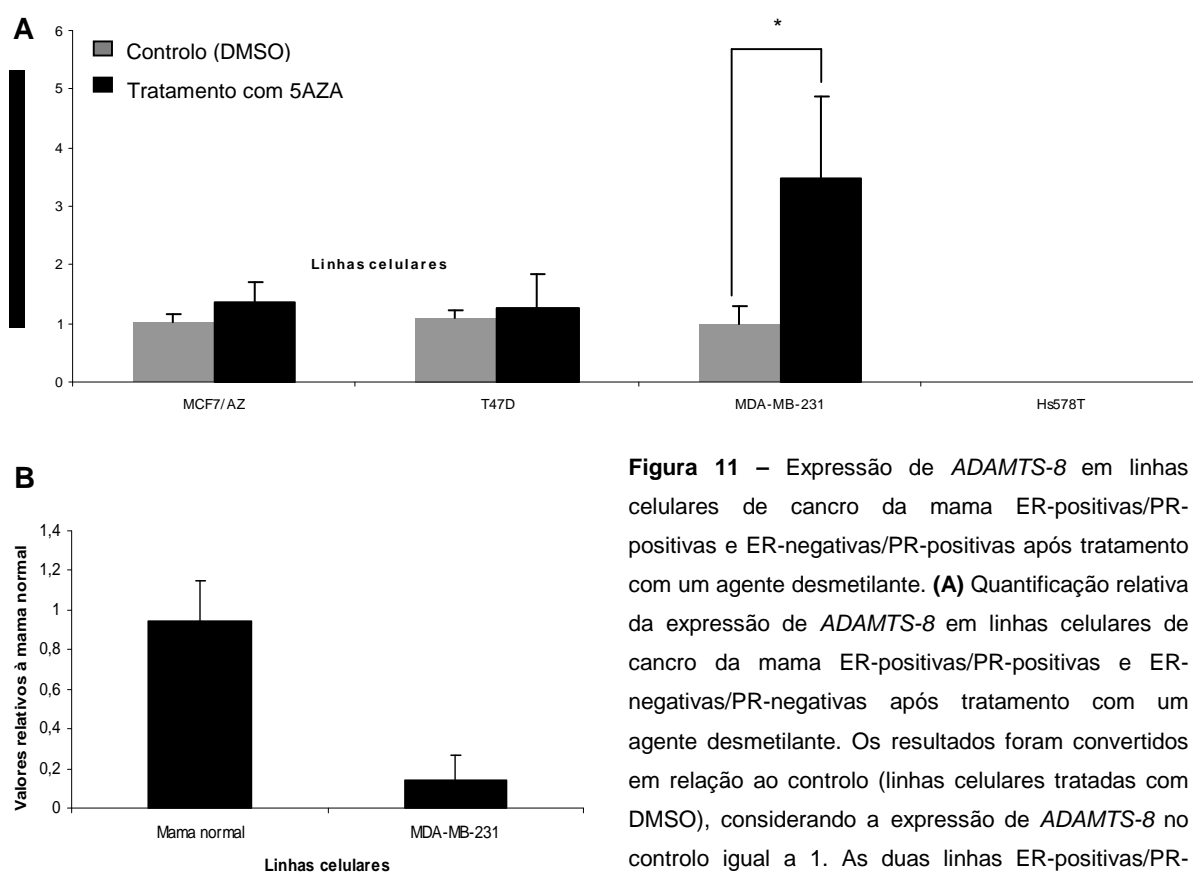
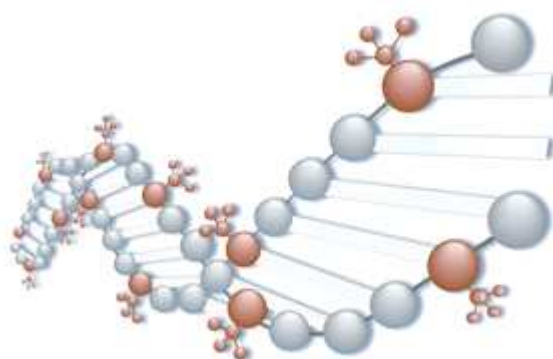


Figura 11 – Expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama ER-positivas/PR-positivas e ER-negativas/PR-positivas após tratamento com um agente desmetilante. **(A)** Quantificação relativa da expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama ER-positivas/PR-positivas e ER-negativas/PR-negativas após tratamento com um agente desmetilante. Os resultados foram convertidos em relação ao controlo (linhas celulares tratadas com DMSO), considerando a expressão de *ADAMTS-8* no controlo igual a 1. As duas linhas ER-positivas/PR-positivas não apresentam qualquer alteração da expressão de *ADAMTS-8*, enquanto que numa das linhas ER-negativas/PR-negativas (MDA-MB-231) se observa um aumento da expressão deste gene, sendo esse aumento estatisticamente significativo. **(B)** Comparação da expressão de *ADAMTS-8* na linha celular MDA-MB-231 após desmetilação com a sua expressão em tecido não neoplásico. A expressão na MDA-MB-231 corresponde a cerca de um sexto da expressão no tecido mamário não neoplásico.

expressão de *ADAMTS-8*, enquanto que numa das linhas ER-negativas/PR-negativas (MDA-MB-231) se observa um aumento da expressão deste gene, sendo esse aumento estatisticamente significativo. **(B)** Comparação da expressão de *ADAMTS-8* na linha celular MDA-MB-231 após desmetilação com a sua expressão em tecido não neoplásico. A expressão na MDA-MB-231 corresponde a cerca de um sexto da expressão no tecido mamário não neoplásico.

DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

Nos últimos anos, várias ADAMTS têm vindo a ser associadas com o cancro. No entanto, o seu papel na tumorigénese continua por ser esclarecido. ADAMTS-8, um membro desta família de proteases, possui a capacidade de inibir a angiogénese, suprimir a vascularização e bloquear a proliferação de células endoteliais [98]. Adicionalmente, existem evidências que demonstram a sua sub-regulação em alguns tipos de cancro, nomeadamente no cancro do pulmão de não pequenas células e em neoplasias malignas do sistema nervoso central [119, 122]. No cancro da mama, *ADAMTS-8* parece estar também sub-regulado [104], contudo a sua acção e influência no desenvolvimento tumoral continuam por clarificar. Com o intuito de tentar perceber a influência de *ADAMTS-8* na tumorigénese, no presente trabalho estudou-se a sua expressão em linhas celulares de cancro da mama e em tecido mamário não neoplásico.

Nos vários ensaios de RT-PCR multiplex verificou-se a sub-expressão de *ADAMTS-8* em seis das sete linhas celulares estudadas, comparativamente com o tecido mamário não neoplásico. Numa das linhas celulares, a T47D, representativa do subtipo de carcinoma da mama ER-positivo/PR-positivo, observou-se a expressão de *ADAMTS-8*, embora de forma não reprodutível. Pensa-se que esta ausência de reprodutibilidade poderá ser uma consequência dos níveis de *ADAMTS-8* expressos nesta linha celular se encontrarem no limite de sensibilidade da técnica de RT-PCR utilizada. Assim, de forma a avaliar as diferenças de expressão correspondentes a níveis inferiores ao limite de detecção desta técnica, quantificaram-se os níveis de mRNA de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real. Para tal, seleccionaram-se quatro linhas celulares do painel de linhas inicialmente testadas (incluindo a T47D), representativas de dois subtipos de carcinomas da mama distintos: os carcinomas ER-positivos/PR-positivos, menos agressivos, e ER-negativos/PR-negativos, de pior prognóstico. Por Western blotting, confirmou-se a expressão do ER e do PR nestas linhas celulares. A quantificação de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real, permitiu-nos confirmar a sua sub-expressão em linhas celulares de cancro da mama em relação ao tecido normal, resultados que são consistentes com os previamente descritos por Porter e colaboradores [104]. Adicionalmente, pela análise dos resultados observou-se uma associação entre os níveis de expressão de *ADAMTS-8* e a expressão dos receptores de estrogénio e progesterona, uma vez que as linhas celulares ER-negativas/PR-negativas apresentaram níveis de mRNA de *ADAMTS-8* que são 8 a 16 vezes inferiores aos das que expressam ER e PR, sendo mesmo que uma das linhas ER-negativas/PR-negativas, a Hs578T, não

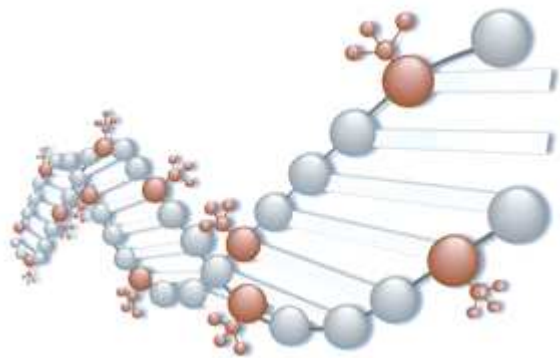
apresentou qualquer expressão detectável de *ADAMTS-8*. Importa referir, contudo, que existe um estudo [124] que descreve uma associação inversamente proporcional entre os níveis de ER e de *ADAMTS-8*, o contrário daquilo que observamos no presente estudo, em que a presença do receptor de estrogénio está associada a níveis de expressão de *ADAMTS-8* mais elevados. No entanto, o método usado no referido estudo para determinação dos níveis de ER não é o clinicamente utilizado actualmente e o cálculo da significância estatística da diferenças dos níveis de mRNA de *ADAMTS-8* entre um grupo de carcinomas da mama com maiores níveis de ER e outro com menores níveis deste receptor é questionável.

Com base nesta associação entre os níveis de expressão de *ADAMTS-8* e a expressão dos receptores de estrogénio e progesterona, colocou-se a hipótese de *ADAMTS-8* ser regulado pelo ER e/ou PR. Uma vez que numa porção significativa de carcinomas da mama os genes que codificam o ER e o PR estão silenciados pela hipermetilação dos seus promotores e que, por outro lado, em carcinomas do pulmão de não pequenas células, *ADAMTS-8* está também sub-regulado pela hipermetilação do seu promotor, tentou-se perceber se o mecanismo de metilação poderia estar a regular a expressão de *ADAMTS-8* no cancro da mama via os receptores hormonais e/ou via o próprio *ADAMTS-8*. Para tal, reavaliaram-se os níveis de *ADAMTS-8* por PCR em tempo real nas quatro linhas celulares previamente usadas na quantificação de *ADAMTS-8*, após o seu tratamento com um agente desmetilante. Nas duas linhas celulares ER-negativas/PR-negativas incluídas nesta análise, a ausência de ER e PR deve-se à hipermetilação do promotor dos seus genes codificantes [86]. Nas linhas celulares ER-positivas/PR-positivas não se encontrou qualquer alteração nos níveis de mRNA de *ADAMTS-8* em relação ao controlo. Por outro lado, numa das duas linhas ER-negativas/PR-negativas, a MDA-MB-231, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,01$) da expressão de *ADAMTS-8* após desmetilação. Este aumento pode ser uma consequência da hipermetilação do promotor de *ADAMTS-8* ou, na medida em que não se observou qualquer efeito nas linhas celulares ER-positivas/PR-positivas, este aumento poderá reflectir uma acção reguladora da desmetilação de ER e/ou PR na expressão de *ADAMTS-8*. De facto, embora pouco se saiba acerca da regulação dos genes *ADAMTS* existem evidências que alguns deles são reguladas por hormonas: a hormona da tiróide tri-iodotironina (T3) sobre-regula *ADAMTS-5* durante a ossificação endocondral [106]; a paratormona sobre-regula a expressão de *ADAMTS-1* no osso e nos osteoblastos [107]; a progesterona (via PR), a hormona luteinizante e a gonadotrofina coriónica humana regulam *ADAMTS-1* durante a ruptura folicular [108, 109]. Assim, a hipótese de *ADAMTS-8* poder ser regulado hormonalmente no cancro da mama, poderá fazer algum sentido neste contexto de evidências já existentes da regulação hormonal nomeadamente de *ADAMTS-1* e *ADAMTS-5*, dois genes que aliás, com base na sua sequência e nos seus substratos-alvo, se encontram filogeneticamente muito próximos de *ADAMTS-8* [125].

O aumento observado após desmetilação representa cerca de um sexto dos níveis de expressão de *ADAMTS-8* detectados no tecido mamário normal, o que sugere a existência de mecanismos de regulação adicionais à metilação. Baseando-nos na hipótese de regulação de *ADAMTS-8* via metilação do *ER* e/ou *PR*, seria também de esperar que, após desmetilação, houvesse um aumento dos níveis de mRNA de *ADAMTS-8* na linha celular Hs578T. Como tal não foi observado, consultou-se um estudo prévio de aCGH (*Array Comparative Genomic Hybridization*) [126] de forma a pesquisar possíveis alterações cromossómicas nesta linha celular, no qual se verificou a deleção da região cromossómica 11q25 onde *ADAMTS-8* está localizado. Assim, seria interessante de futuro estudar linhas celulares de cancro da mama ER-negativas/PR-negativas adicionais, de modo a confirmar esta relação entre metilação do *ER* e expressão de *ADAMTS-8*.

A sub-expressão de *ADAMTS-8* em linhas celulares de cancro da mama, bem como a relação inversamente proporcional entre os níveis de expressão de *ADAMTS-8* e a ‘agressividade’ das linhas celulares que encontramos, são consistentes com um possível papel desta proteína no controlo negativo da tumorigénese. Esta possibilidade de *ADAMTS-8* constituir um gene supressor tumoral é suportada pela sua capacidade de inibição da angiogénese induzida pelo VEGF, de supressão da vascularização induzida pela FGF-2 e de bloqueio da proliferação de células endoteliais, bem como pela sua sub-regulação em diferentes tipos de cancro, particularmente no cancro da mama [98, 104].

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

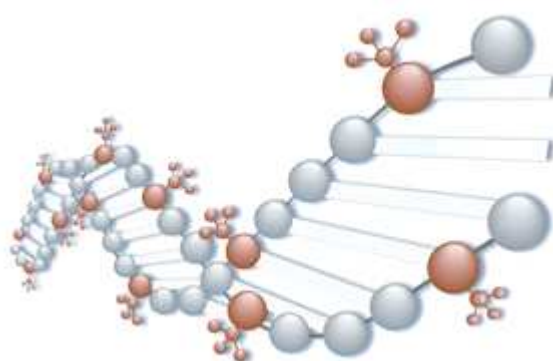


CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados mostram que *ADAMTS-8* é sub-expresso em linhas celulares de cancro da mama comparativamente com o tecido mamário não neoplásico. Adicionalmente, encontrara-se evidências de uma relação entre *ADAMTS-8* e os receptores de estrogénio e progesterona, suportada pela associação de menores níveis de mRNA de *ADAMTS-8* nas linhas celulares de cancro da mama ER-negativas/PR-negativas, bem como pelo aumento da expressão de *ADAMTS-8* numa linha celular ER-negativa/PR-negativa cujos promotores de *ER* e de *PR* se encontram hipermetilados. Estes resultados são consistentes com a possibilidade de *ADAMTS-8* poder ser um gene supressor de tumor no cancro da mama, suportada pelo seu controlo negativo da angiogénese, vascularização e proliferação, assim como pela sua sub-expressão em vários tipos de cancro, nomeadamente no cancro da mama.

De futuro seria interessante: (i) estudar o efeito da desmetilação em linhas celulares de cancro da mama adicionais, sobretudo em linhas ER-negativas/PR-negativas; (ii) quantificar a expressão de *ADAMTS-8* em amostras clínicas de carcinomas da mama e correlacioná-la com parâmetros clinicopatológicos e (iii) analisar o estado de metilação dos promotores de *ADAMTS-8*, *ER* e *PR* em linhas celulares de cancro da mama e em casos de carcinomas da mama para avaliar se de facto o ER e/ou o PR tem um papel na regulação de *ADAMTS-8*.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

1. Schulz, W. A. *Molecular Biology of Human Cancers*. 2005.
2. Doll, R. and Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 66: 1191-1308, 1981.
3. Foulds, L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*, 14: 327-339, 1954.
4. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28, 1976.
5. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
6. Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. Growth factors. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins) 41-64, 1997.
7. Yarden, Y., and Ullrich, A. EGF and erbB receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem*, 57: 443-478, 1988.
8. Harris, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17: 1187-1198, 1996.
9. Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62: 1180-1190, 1997.
10. Shay, J. W., and Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 33: 787-791, 1997.
11. Bryan, T. M., and Cech, T.R. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Cell Biol*, 11: 318-324, 1999.
12. Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S.C. How tumors become angiogenic. *Cancer Res*, 69: 135-174, 1996.
13. Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.

14. Folkman, J. Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins) 181-204, 1997.
15. Christofori, G., and Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 73-76, 1999.
16. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55: 74-108, 2005.
17. Dados Epidemiológicos de Cancro da Mama na População Portuguesa. International Agency for Research on Cancer - IARC: www-dep.iarc.fr, acedido em 13 de Julho de 2007.
18. Marshall, E. Epidemiology. Search for a killer: focus shifts from fat to hormones. *Science*, 259: 618-621, 1993.
19. Weir, H. K., Thun, M. J., Hankey, B. F., Ries, L. A., Howe, H. L., Wingo, P. A., Jemal, A., Ward, E., Anderson, R. N., and Edwards, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1276-1299, 2003.
20. Fisher, B., Slack, N., Katrych, D., and Wolmark, N. Ten year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a co-operative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obstet*, 140: 528-534, 1975.
21. Baselga, J. and Norton, L. Focus on breast cancer. *Cancer Cell*, 1: 319-322, 2002.
22. Clarke, R. B., Anderson, E., Howell, A., and Potten, C. S. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif*, 36 *Suppl 1*: 45-58, 2003.
23. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Robbins and Coltran - *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders, 2005.
24. Deugnier, M. A., Teuliere, J., Faraldo, M. M., Thiery, J. P., and Glukhova, M. A. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res*, 4: 224-230, 2002.
25. Nixon, A. J., Neuberg, D., Hayes, D. F., Gelman, R., Connolly, J. L., Schnitt, S., Abner, A., Recht, A., Vicini, F., and Harris, J. R. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*, 12: 888-894, 1994.

26. Fowble, B. L., Schultz, D. J., Overmoyer, B., Solin, L. J., Fox, K., Jardines, L., Orel, S., and Glick, J. H. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30: 23-33, 1994.
27. Natarajan, N., Nemoto, T., Mettlin, C., and Murphy, G. P. Race-related differences in breast cancer patients. Results of the 1982 national survey of breast cancer by the American College of Surgeons. *Cancer*, 56: 1704-1709, 1985.
28. Eley, J. W., Hill, H. A., Chen, V. W., Austin, D. F., Wesley, M. N., Muss, H. B., Greenberg, R. S., Coates, R. J., Correa, P., Redmond, C. K., and et al. Racial differences in survival from breast cancer. Results of the National Cancer Institute Black/White Cancer Survival Study. *Jama*, 272: 947-954, 1994.
29. Newman, L. A., Kuerer, H. M., Hunt, K. K., Singh, G., Ames, F. C., Feig, B. W., Ross, M. I., Taylor, S., and Singletary, S. E. Local recurrence and survival among black women with early-stage breast cancer treated with breast-conservation therapy or mastectomy. *Ann Surg Oncol*, 6: 241-248, 1999.
30. Haas, J. A., Schultz, D. J., Peterson, M. E., and Solin, L. J. An analysis of age and family history on outcome after breast-conservation treatment: the University of Pennsylvania experience. *Cancer J Sci Am*, 4: 308-315, 1998.
31. Hennighausen, L. and Robinson, G. W. Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell*, 1: 467-475, 2001.
32. Russo, I. H. and Russo, J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3: 49-61, 1998.
33. Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J., and Thun, M. J. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*, 55: 10-30, 2005.
34. Mettlin, C. Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, 49: 138-144, 1999.
35. Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C., and Mulvihill, J. J. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*, 81: 1879-1886, 1989.
36. Claus, E. B., Risch, N., and Thompson, W. D. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*, 48: 232-242, 1991.

37. Domchek, S. M., Eisen, A., Calzone, K., Stopfer, J., Blackwood, A., and Weber, B. L. Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice. *J Clin Oncol*, 21: 593-601, 2003.
38. Berry, D. A., Parmigiani, G., Sanchez, J., Schildkraut, J., and Winer, E. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *J Natl Cancer Inst*, 89: 227-238, 1997.
39. Ottini, L., Masala, G., D'Amico, C., Mancini, B., Saieva, C., Aceto, G., Gestri, D., Vezzosi, V., Falchetti, M., De Marco, M., Paglierani, M., Cama, A., Bianchi, S., Mariani-Costantini, R., and Palli, D. BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer: a population-based study in Italy. *Cancer Res*, 63: 342-347, 2003.
40. Stratton, M. R., Ford, D., Neuhasen, S., Seal, S., Wooster, R., Friedman, L. S., King, M. C., Egilsson, V., Devilee, P., McManus, R., and et al. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nat Genet*, 7: 103-107, 1994.
41. Zhang, D. H., Salto-Tellez, M., Chiu, L. L., Shen, L., and Koay, E. S. Tissue microarray study for classification of breast tumors. *Life Sci*, 73: 3189-3199, 2003.
42. van't Veer, L. J., Paik, S., and Hayes, D. F. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J Clin Oncol*, 23: 1631-1635, 2005.
43. Ahr, A., Holtrich, U., Solbach, C., Scharl, A., Strebhardt, K., Karn, T., and Kaufmann, M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol*, 195: 312-320, 2001.
44. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
45. Matos, I., Dufloth, R., Alvarenga, M., Zeferino, L. C., and Schmitt, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*, 447: 688-694, 2005.
46. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lonning, P. E., Brown, P. O., Borresen-Dale, A. L., and Botstein, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8418-8423, 2003.

47. Toillon, R. A., Magne, N., Laios, I., Lacroix, M., Duvillier, H., Lagneaux, L., Devriendt, D., Van Houtte, P., and Leclercq, G. Interaction between estrogen receptor alpha, ionizing radiation and (anti-) estrogens in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 93: 207-215, 2005.
48. Ricardo, S. A., Milanezi, F., Carvalho, S. T., Leitao, D. R., and Schmitt, F. C. HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol*, 60: 1001-1005, 2007.
49. Lakhani, S. R. and O'Hare, M. J. The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res*, 3: 1-4, 2001.
50. Filho, G. B. Bogliolo Patologia. Capítulo da Mama. Editora Guanabara Koogan, 7ª Edição, 2006.
51. Elston, C. W. and Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19: 403-410. *Histopathology*, 41: 151, 2002.
52. Keen, J. C. and Davidson, N. E. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 97: 825-833, 2003.
53. Bankfalvi, A., Simon, R., Brandt, B., Burger, H., Vollmer, I., Dockhorn-Dworniczak, B., Lelle, R. J., and Boecker, W. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, 37: 411-419, 2000.
54. Bange, J., Zwick, E., and Ullrich, A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med*, 7: 548-552, 2001.
55. Park, D., Karesen, R., Noren, T., and Sauer, T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch*, 451: 11-18, 2007.
56. Giancotti, V. Breast cancer markers. *Cancer Lett*, 243: 145-159, 2006.
57. Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G., and Davidson, N. E. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, 61: 7025-7029, 2001.

58. Ferguson, A. T., Vertino, P. M., Spitzner, J. R., Baylin, S. B., Muller, M. T., and Davidson, N. E. Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase.DNA adduct formation in 5-aza-2'deoxyctidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 272: 32260-32266, 1997.
59. Robertson, K. D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20: 3139-3155, 2001.
60. Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K., and Herman, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*, 10: 687-692, 2001.
61. Feinberg, A. P., Oshimura, M., and Barrett, J. C. Epigenetic mechanisms in human disease. *Cancer Res*, 62: 6784-6787, 2002.
62. Bestor, T. H. and Verdine, G. L. DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*, 6: 380-389, 1994.
63. Bestor, T. H. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature*, 393: 311-312, 1998.
64. Vanyushin, B. F., Tkacheva, S. G., and Belozersky, A. N. Rare bases in animal DNA. *Nature*, 225: 948-949, 1970.
65. Antequera, F. and Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 11995-11999, 1993.
66. Cross, S. H. and Bird, A. P. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 309-314, 1995.
67. Forne, T., Oswald, J., Dean, W., Saam, J. R., Bailleul, B., Dandolo, L., Tilghman, S. M., Walter, J., and Reik, W. Loss of the maternal H19 gene induces changes in Igf2 methylation in both cis and trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 10243-10248, 1997.
68. Reik, W. and Walter, J. Imprinting mechanisms in mammals. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 154-164, 1998.
69. Heard, E. and Avner, P. Role play in X-inactivation. *Hum Mol Genet*, 3 *Spec No*: 1481-1485, 1994.
70. Heard, E., Clerc, P., and Avner, P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet*, 31: 571-610, 1997.

71. Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366: 362-365, 1993.
72. Weiss, A. and Cedar, H. The role of DNA demethylation during development. *Genes Cells*, 2: 481-486, 1997.
73. Keshet, I., Yisraeli, J., and Cedar, H. Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 2560-2564, 1985.
74. Cedar, H. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53: 3-4, 1988.
75. Chan, M. F., Liang, G., and Jones, P. A. Relationship between transcription and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 249: 75-86, 2000.
76. Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13: 335-340, 1997.
77. Laird, C. D., Pleasant, N. D., Clark, A. D., Sneed, J. L., Hassan, K. M., Manley, N. C., Vary, J. C., Jr., Morgan, T., Hansen, R. S., and Stoger, R. Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 204-209, 2004.
78. Jaenisch, R. and Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 *Suppl*: 245-254, 2003.
79. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., and Herman, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61: 3225-3229, 2001.
80. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21: 5427-5440, 2002.
81. Lapidus, R. G., Nass, S. J., Butash, K. A., Parl, F. F., Weitzman, S. A., Graff, J. G., Herman, J. G., and Davidson, N. E. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 58: 2515-2519, 1998.
82. Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321: 209-213, 1986.
83. Lapidus, R. G., Ferguson A.T., Ottaviano, Y.L., Parl, F.F., Smith, H.S., Weitzman, S.A., Baylin, S.B., Issa, J-P., and Davidson N.E. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clinical Cancer Research*, 2: 805-810, 1996.

84. Hortobagyi, G. N. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 339: 974-984, 1998.
85. Ferguson, A. T., Lapidus, R. G., and Davidson, N. E. Demethylation of the progesterone receptor CpG island is not required for progesterone receptor gene expression. *Oncogene*, 17: 577-583, 1998.
86. Yan, L., Nass, S. J., Smith, D., Nelson, W. G., Herman, J. G., and Davidson, N. E. Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*, 2: 552-556, 2003.
87. Zhu, W. G. and Otterson, G. A. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 3: 187-199, 2003.
88. Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., and Matsushima, K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*, 272: 556-562, 1997.
89. Seals, D. F. and Courtneidge, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 17: 7-30, 2003.
90. Kuno, K. and Matsushima, K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem*, 273: 13912-13917, 1998.
91. Bode W., G.-R. F. X., Stockler, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Metturn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, 331: 134-140, 1993.
92. Rawlings N. D., B. A. J. Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods Enzymol*, 248: 183-228, 1995.
93. Bornstein, P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J*, 6: 3290-3299, 1992.
94. Wang, W. M., Lee, S., Steiglitz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K., and Greenspan, D. S. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. *J Biol Chem*, 278: 19549-19557, 2003.

95. Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J Biol Chem*, 270: 16724-16730, 1995.
96. Colige, A., Li, S. W., Sieron, A. L., Nusgens, B. V., Prockop, D. J., and Lapiere, C. M. cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 2374-2379, 1997.
97. Fernandes, R. J., Hirohata, S., Engle, J. M., Colige, A., Cohn, D. H., Eyre, D. R., and Apte, S. S. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem*, 276: 31502-31509, 2001.
98. Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M., and Iruela-Arispe, M. L. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem*, 274: 23349-23357, 1999.
99. Blelloch, R., Anna-Arriola, S. S., Gao, D., Li, Y., Hodgkin, J., and Kimble, J. The gon-1 gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 216: 382-393, 1999.
100. Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., and Nozaki, C. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)*, 130: 475-480, 2001.
101. Sadler, J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67: 395-424, 1998.
102. Furlan, M., Robles, R., and Lamie, B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87: 4223-4234, 1996.
103. Tsai, H. M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87: 4235-4244, 1996.
104. Porter, S., Scott, S. D., Sassoon, E. M., Williams, M. R., Jones, J. L., Girling, A. C., Ball, R. Y., and Edwards, D. R. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10: 2429-2440, 2004.

105. Masui, T., Hosotani, R., Tsuji, S., Miyamoto, Y., Yasuda, S., Ida, J., Nakajima, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, H., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Arii, S., Doi, R., and Imamura, M. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 7: 3437-3443, 2001.
106. Makihiro, S., Yan, W., Murakami, H., Furukawa, M., Kawai, T., Nikawa, H., Yoshida, E., Hamada, T., Okada, Y., and Kato, Y. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage. *Endocrinology*, 144: 2480-2488, 2003.
107. Miles, R. R., Sluka, J. P., Halladay, D. L., Santerre, R. F., Hale, L. V., Bloem, L., Thirunavukkarasu, K., Galvin, R. J., Hock, J. M., and Onyia, J. E. ADAMTS-1: A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs is a target for parathyroid hormone in bone. *Endocrinology*, 141: 4533-4542, 2000.
108. Robker, R. L., Russell, D. L., Espey, L. L., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., and Richards, J. S. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4689-4694, 2000.
109. Espey, L. L., Yoshioka, S., Russell, D. L., Robker, R. L., Fujii, S., and Richards, J. S. Ovarian expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod*, 62: 1090-1095, 2000.
110. Hashimoto, T., Wen, G., Lawton, M. T., Boudreau, N. J., Bollen, A. W., Yang, G. Y., Barbaro, N. M., Higashida, R. T., Dowd, C. F., Halbach, V. V., and Young, W. L. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke*, 34: 925-931, 2003.
111. Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., and Brew, K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*, 276: 12501-12504, 2001.
112. Arner, E. C., Pratta, M. A., Trzaskos, J. M., Decicco, C. P., and Tortorella, M. D. Generation and characterization of aggrecanase. A soluble, cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem*, 274: 6594-6601, 1999.
113. Rodriguez-Manzaneque, J. C., Westling, J., Thai, S. N., Luque, A., Knauper, V., Murphy, G., Sandy, J. D., and Iruela-Arispe, M. L. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 293: 501-508, 2002.

114. Kramerova, I. A., Kawaguchi, N., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Chen, Y., Kramerov, A. A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J. M., Ackley, B. D., Sieron, A. L., Prockop, D. J., and Fessler, J. H. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development*, 127: 5475-5485, 2000.
115. Georgiadis, K. E., Hirohata, S., Seldin, M. F., and Apte, S. S. ADAM-TS8, a novel metalloprotease of the ADAM-TS family located on mouse chromosome 9 and human chromosome 11. *Genomics*, 62: 312-315, 1999.
116. Gentile, M., Wiman, A., Thorstenson, S., Loman, N., Borg, A., and Wingren, S. Deletion mapping of chromosome segment 11q24-q25, exhibiting extensive allelic loss in early onset breast cancer. *Int J Cancer*, 92: 208-213, 2001.
117. Gentile, M., Olsen, K., Dufmats, M., and Wingren, S. Frequent allelic losses at 11q24.1-q25 in young women with breast cancer: association with poor survival. *Br J Cancer*, 80: 843-849, 1999.
118. Koreth, J., Bakkenist, C. J., Larin, Z., Hunt, N. C., James, M. R., and McGee, J. O. 11q23.1 and 11q25-qter YACs suppress tumour growth in vivo. *Oncogene*, 18: 1157-1164, 1999.
119. Heighway, J., Knapp, T., Boyce, L., Brennand, S., Field, J. K., Betticher, D. C., Ratschiller, D., Gugger, M., Donovan, M., Lasek, A., and Rickert, P. Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification. *Oncogene*, 21: 7749-7763, 2002.
120. de Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J. J., and Van Meir, E. G. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med*, 7: 401-407, 2001.
121. Collins-Racie, L. A., Flannery, C. R., Zeng, W., Corcoran, C., Annis-Freeman, B., Agostino, M. J., Arai, M., DiBlasio-Smith, E., Dorner, A. J., Georgiadis, K. E., Jin, M., Tan, X. Y., Morris, E. A., and LaVallie, E. R. ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biol*, 23: 219-230, 2004.
122. Dunn, J. R., Panutsopoulos, D., Shaw, M. W., Heighway, J., Dormer, R., Salmo, E. N., Watson, S. G., Field, J. K., and Liloglou, T. METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC. *Br J Cancer*, 91: 1149-1154, 2004.
123. Dunn, J. R., Reed, J. E., du Plessis, D. G., Shaw, E. J., Reeves, P., Gee, A. L., Warnke, P., and Walker, C. Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br J Cancer*, 94: 1186-1193, 2006.
124. Porter, S., Span, P. N., Sweep, F. C., Tjan-Heijnen, V. C., Pennington, C. J., Pedersen, T. X., Johnsen, M., Lund, L. R., Romer, J., and Edwards, D. R. ADAMTS8 and ADAMTS15

expression predicts survival in human breast carcinoma. *Int J Cancer*, 118: 1241-1247, 2006.

125. Lhamazares, M., Cal, S., Quesada, V. and López-Otín, C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique Gon domain. *J. Biol. Chem.* , 278: 13382-13389, 2003.
126. Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., and Gray, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10: 515-527, 2006.